

**KÖNNY ÉS CORNEÁLIS BIOMARKEREK SZEREPE SZEMÉSZETI ÉS
SZISZTÉMÁS BETEGSÉGEK KORAI DIAGNOSZTIKÁJÁBAN**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DR. CSUTAK ADRIENNE



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR SZEMÉSZETI KLINIKA

Pécs, 2020

1. BEVEZETÉS

1.1 Könnyfilm

A humán könny víztiszta, enyhén lúgos (pH: 7,2-7,4), sós ízű folyadék. Egyenletes, kb. $3,4 \pm 2,6$ μm vastag film formájában fedi a szaruhártya (cornea) és kötőhártya (conjunctiva) felszínét. Termeléséért a fő könnymirigy (glandula lacrimalis), a járulékos könnymirigyek, valamint a kötőhártya kehelysejtjei együttesen tehetők felelőssé. Átlagos termelésük mértéke megközelítőleg 2 μl /perc. A könnyfilm pislogás révén néhány másodpercenként képződik újra, mely időintervallum meghatározza az evaporáció mértékét is.

A könnyfilm megfelelő mennyiségi és minőségi összetétele elengedhetetlen a tökéletes látásélesség, a szaruhártya és kötőhártya védelme és táplálása szempontjából. Összetételét a könnymirigyek által termelt, a szaruhártya és a kötőhártya sejtjei által szekretált és a vérből átkerülő fehérjék határozzák meg elsősorban. Elektroforetikus módszerrel Gachon és mtsai kb. 60 féle fehérjét azonosítottak a könnyben, majd a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és tömegspektrometriás (MS) módszerek megjelenésével több mint 1500 fehérjét ismerhettünk meg. Ezen fehérjék három fő csoportba sorolhatóak: i) a szérumban is azonosítható fehérjék ii) csak a könnyben fellelhető fehérjék, iii) a könnyben és az epitel sejtekben is detektálható fehérjék. A könny fehérjék legjelentősebb képviselői: lizozim, laktoferrin, lipokalin és a lakritin.

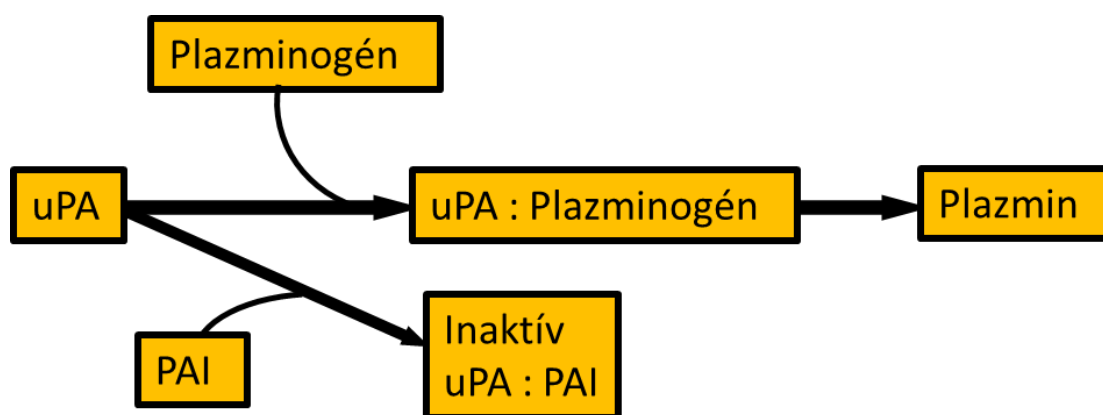
A szem elülső szegmensében lévő könnyfilmréteg számos fehérjéjének a differenciális megjelenése, illetve mennyiségi változása jellemzi a szaruhártya sebgyógyulási folyamatait, továbbá jellemző lehet bizonyos betegségekre, kórképekre is.

Jelen dolgozat a könny és corneális biomarkerekre fókuszál, nevezetesen i) a szaruhártya fotorefraktív lézerkezeléseit (fotorefraktív keratektómia (PhotoRefractive Keratectomy, PRK és lézer-asszisztált *in situ* keratomileusis (LASer- Assisted *in situ* Keratomileusis, LASIK) követő sebgyógyulási folyamatokat és ii) a cukorbetegség szemészeti szövődésményei közül a szaruhártyában (cornea) és az ideghártyában (retina) bekövetkező elváltozásokat kísérő fehérjemintázat változás jellegzetességeit és további potenciális biomarkereit vizsgálja.

1.2 Plazminogén aktivátor-plazminrendszer működése, és jelentősége a könnyfilmben és a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban

Ismereteink szerint a szaruhártya sebgyógyulási folyamatait két nagy rendszer szabályozza aktivátorok és inhibitorok útján, melyek megfelelő működése és egyensúlya elengedhetetlen a reepitelizáció szempontjából. A plazminogén aktivátor-plazminrendszer a degradációért és a károsodott extracelluláris mátrix eltakarításáért felelős, az aktivált keratociták a károsodott kollagén struktúrák helyére az újonnan szintetizálendő kollagén fibrillumokat hozzák létre.

A plazminogén aktivátorok (PA) specifikus szerin proteázok, az inaktív plazminogént aktív plazminná képesek alakítani. Két fő típusuk ismert, a szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA) és az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA). A normál könny nagy mennyiségű urokináz antigént tartalmaz, mely molekula tömege alapján inhibitor-komplex formájában van jelen, az uPA aktivitása kismértékű és tPA gyakorlatilag nem detektálható. A könny proteáz inhibitor (α_1 -antitripszin, α_2 -makroglobulin) tartalma igen alacsony.



1. ábra Az uPA aktivitás kinetikai modellje a szaruhártya sebgyógyulási folyamatában. Az inaktív plazminogén aktív plazminná történő átalakításáért az aktivátoraik felelősek, deaktiválásukat inhibitoraik végzik.

A tPA elsősorban a vér fibrinolitikus aktivitásában játszik szerepet, termeléséért és a vérbe történő szekretálásáért elsősorban a vaszkuláris endotél sejtek felelősek. Gátlásában a plazminogén aktivátor inhibitor 1-es típusa (PAI-1) a legjelentősebb.

Az uPA-nak elsődleges szerepe az extracelluláris proteolízisben van és valószínűleg szerepet játszik a tumorok metasztázis képzésében, illetve inváziójában is. Az urokináz potenciális leukocita kemoattraktánsként is ismert, és emiatt szerepe lehet sejtadhéziós, migrációs, leukocita extravazációs és szöveti infiltrációs folyamatokban. Az uPA-t endoteliális

sejtek, makrofágok és különböző típusú leukociták szintetizálják. Megtalálható a könnyben, s feltehetően a kötőhártya és a szaruhártya epitel sejtjei szekretálják. PAI-1 antigént nem sikerült normál könnyben kimutatni, így valószínűleg más inhibitorok játszhatnak szerepet az uPA gátlásában, mely forrása a könnymirigy, és/vagy a szem elülső szegmensében található sejtek.

A szaruhártya és kötőhártya epitel sejtjeinek károsodása következtében a könnybe nagyobb mennyiségű uPA kerülhet. Patológias esetekben a kötőhártya ereinek permeabilitás fokozódása révén proteázok proenzim formái és proteáz inhibitorok is kerülnek a könnybe. A szem elülső szegmensében mért urokináz szint tehát számos folyamat eredményeként jöhet létre.

Ismert a könny uPA aktivitásának megemelkedése a szaruhártya refraktív lézersebészeti beavatkozásait követően, mely arra utal, hogy a fibrinolitikus rendszer szerepet játszhat a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban. PRK kezelést követően, a harmadik posztoperatív napon mért alacsony könny uPA aktivitási értékek és a késői posztoperatív subepiteliális homály (haze) kialakulása között munkacsoportunk igazolt szignifikáns összefüggést. Tervo és mtsai immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták az uPA erőteljes, a PAI-1 gyenge és a tPA alig kimutatható jelenlétét a szaruhártya sebzés területében.

A szaruhártya és a kötőhártya gyulladásos kórképeiben, valamint kémiai sérülések esetén a könny uPA aktivitása megemelkedik. Amennyiben szaruhártyafekély alakul ki az epitel sejtek, valamint a polimorfonukleáris leukociták is hozzájárulhatnak a könny jelentős mértékű uPA szint emelkedéséhez. Ilyen esetekben, a könny proteáz (α_1 -antitripszin, α_2 -makroglobulin) inhibitorok mennyisége is lényegesen megemelkedik. Az inhibitorok valószínűleg a kötőhártya ereinek permeabilitás fokozódása révén kerülnek a könnybe, az α_1 -antitripszin esetében azonban lokális termelés is valószínűsíthető. Amennyiben a károsodás eléri azt a mértéket, hogy az uPA aktivitás a transzszudációval a könnybe kerülő inhibitorokat kimeríti, a könny proteolitikusan aktívvá válhat a plazmin folyamatos termelődése következtében. A széles szubsztrát specificitású aktív plazmin a prokollagenázt aktiválja kollagenázzá, mely jelentős mértékű szövetkárosodást, a szaruhártya alapállományának proteolitikus lebontását, akár szaruhártya fekély kialakulását eredményezi.

A plazminogén aktivátor-plazmin rendszer érzékeny egyensúlya a könnyfimben tehát hasznos és kívánatos, felborulása esetén azonban két irányba tolhatja el az enzimátikus folyamatokat. Egyrészt kóros sebgyógyulás (corneális strómahomály, haze) kialakulását idézheti elő, másrészt az aktív enzimátikus bomlás révén szaruhártya fekély, vagy akár szaruhártya perforáció alakulhat ki.

1.3 A szaruhártya refraktív-lézersebészete

A szem törőerejének veleszületett vagy szerzett hibái igen gyakoriak, hozzávetőlegesen 2,3 milliárd embert érintenek a világon. A miópia különösen a fiatal felnőttek körében gyakori, Európában körülbelül 227,2 millió ember lehet rövidlátó. A látásélesség tökéletes korrekciójára rendkívül nagy az igény, legyen az szemüvegrendelés, kontaktlencse illesztés vagy akár műtéti beavatkozás. Egy jól megválasztott műtéti technika szövődménymentes esetben az egyén számára ideális megoldás.

A szem fénytörésének műtéti módosítására alapvetően két lehetőség van. Az egyik, leggyakrabban alkalmazott műtéti technika a szaruhártya törőerejének módosítása, mellyel a szem össztörőereje és a szemtengely hossza között felborult arány kerül korrekcióra, annak érdekében, hogy a szembe bejutó fénysugarak az éleslátás helyén egy fókuszpontban egyesülhessenek a retinán. A szaruhártya „átformálásának” leggyakrabban alkalmazott módja valamilyen típusú lézeres beavatkozás, ezen kívül alkalmazható módszerek még szaruhártyába ültethető eszközök – gyűrűk vagy lencsék – melyek ritkább, súlyosabb fénytörési hiba esetén jelenthetnek segítséget. A másik lehetőség, a szemlencse cseréje optimális törőerővel rendelkező beültethető műanyag lencsére. A műtéti technikák teljes ismertetésének igénye nélkül, a leggyakrabban alkalmazott és általunk tanulmányozott technikák kerülnek ismertetésre: a PRK és LASIK kezelések.

PRK kezelés során, a szaruhártya epiteliális rétegeinek - meghatározott területű – eltávolítása lokális érzéstelenítés mellett mechanikai, kémiai vagy lézeres úton történhet, melyet a szaruhártya lézerrel történő átalakítása követ. Miópia korrekciója során, a szaruhártya relatív görbületét csökkentjük a lézerkezeléssel, minek következtében csökken a szaruhártya fénytörése, és így a szembe beeső fénysugarak fókuszpontja az üvegtesti térből hátrébb helyeződik, optimális esetben a retina felszínére (a makulára). Hipermetrópia kezelése során célunk éppen ellentétes, a szaruhártya relatív görbületét növeljük, és ezáltal fokozzuk refraktív erejét. A PRK kezelés leggyakoribb, esetenként a késői látásélességet is csökkentő komplikációi a refrakciós regresszió és a haze kialakulása a szaruhártyában. A PRK típusú műtéti technika elvégzése biztonsággal javasolt közepes és kis fokú miópia esetén, valamint 4,25 D hipermetrópia korrekciójáig. Az életkor nem befolyásolja a haze kialakulását, az UV expozíció azonban fokozza a subepiteliális homály és a miópiás regresszió valószínűségét is. A haze kialakulásának pontos pathomechanizmusa a mai napig nem ismert, de valószínűleg a strómában aktiválódó keratociták és a bevándorló gyulladásos sejtek tehetők felelőssé kialakulásáért.

Az ún. lebenyes technikák (pl. LASIK) a haze kialakulásának kiküszöbölése céljából kerültek kifejlesztésre. Az eljárás során egy speciális, mechanikus eszköz (mikrokeratóm) vagy femtoszekundum lézer segítségével képeznek lebenyt a szaruhártya felső rétegeiből. A szemfelszínen képzett lebeny felhajtását követően az excimer lézer "elpárologtatja" a kívánt korrekciónak megfelelő strómális szövet mennyiséget, majd a lebeny visszahajtásra kerül eredeti pozíciójába a szaruhártya felszínére. A LASIK kezelés előnye a PRK-val szemben, a minimális posztoperatív fájdalom, a kisebb mértékű strómális keratocita aktiváció és refrakciós regresszió. A látásélesség javulása gyors, néhány órát vagy napot vesz igénybe, bár az első néhány héten a látásélesség fluktuációja számos esetben megfigyelhető. Hátrányai lehetnek intra- és posztoperatívek, melyek elsősorban a lebeny készítésével, ill. a készített lebennyel kapcsolatosak. Jól ismertek a lebeny okozta nem kívánt posztoperatív vizuális jelenségek: a káprázás (glare), csillagszórás típusú jelenség (starburst) és a fényforrás körül megjelenő fényudvar (halo); mely akár a kezelt betegek 12%-át is érinti. A lebeny készítése továbbá a szaruhártya szenzoros denervációját eredményezi, mely száraz szem kialakulásához vezethet.

Mindkét fent ismertetett műtéti kezelés kapcsán számoltak már be refraktív komplikációkról: alulkorrekció, regresszió, asztigmia kialakulásáról. A páciens körültekintő kivizsgálása és megfelelően megválasztott műtéti technika esetén, mindkét refraktív típusú sebészeti beavatkozás biztonságosnak tekinthető.

1.4 Diabétesz mellitusz

A diabétesz mellitusz (DM) etiológiáját tekintve egy több okra visszavezethető, változatos patogenezisű anyagcsere betegség. Patogenezisének két fő típusa különíthető el: i) az I. típus, autoimmun vagy autoimmun jelleggel bíró szindróma esetében valamilyen immunológiai mechanizmus következtében, vagy ismeretlen okból abszolút inzulinhiány alakul ki, ii) a II. típus, metabolikus szindróma esetében relatív inzulinhiány vagy perifériás inzulin rezisztencia áll a betegség kialakulásának hátterében. A DM mindkét típusára jellemző, hogy a betegség huzamosabb fennállását követően krónikus szövődmények alakulhatnak ki, amely különösen igaz azon esetekben, amikor a betegség sokáig marad kezeletlenül a késői diagnózis felállítása miatt. A tartós anyagcserezavar következtében kialakuló legsúlyosabb következmények; az ér és idegrendszeri szövődmények megjelenése, különböző szervek károsodása, diszfunkciója és akár teljes leállása. Az alapbetegség korai felismerése és adekvát kezelése alapvető a DM krónikus szövődményeinek megelőzésében, súlyosságának csökkentésében. A vércukorszint normál határok között tartása az egyik legfontosabb

befolyásolható tényező, mely jelentős mértékben csökkenti a komplikáció kialakulásának valószínűségét.

A diabéteszes retinopátia (DR) a cukorbetegség egyik leggyakoribb szövődménye, mely a cukorbeteg 90%-ánál megjelenik életük során. A fejlett országok munkaképes lakosságának körében a DR a vakság kialakulásának vezető oka. Háttere elsősorban vaszkuláris eredetű, melyet az alábbi fundusfotó elváltozások jellemeznek a leggyakrabban: mikroaneurizma (MA), vérzések, retinális iszkémia, exszudátumok, intraretinális mikrovaszkuláris abnormalitások, vénás kaliber ingadozások és neovaszkularizációk, valamint a vaszkuláris permeabilitás fokozott jelei. A DR súlyossága szerint több csoportba osztható, az enyhe háttér retinopátiától a kifejezett, nem proliferatív retinopátián át, a proliferatív retinopátia kialakulásáig. A DR súlyossága szoros korrelációt mutat a cukorbetegség fennállásának időtartamával, a vércukorszinttel és a magas vérnyomással. Egyéb rizikófaktorok továbbá a magas szisztolés és diasztolés vérnyomás értékek, a diszlipidémia, a nefropátia és a fertőzések jelenléte. A cukorbetegség talaján kialakuló retinopátia progressziója, korai felismeréssel és szükség esetén időben alkalmazott szemészeti kezeléssel megelőzhető, illetve jelentős mértékben csökkenthető, így korai felismerésük és kezelésük alapvető fontosságú. A vakság kialakulásának relatív kockázata a cukorbeteg körében kb. huszonötször nagyobb, mint az egészséges populációban. A DR szűrése a fentiekből is következően társadalmi szintű jelentőségű.

Számos szemészeti szűrőprogramot indítottak világszerte a DR időben történő felismerésére, azzal a céllal, hogy a rendszeres szemészeti szűrővizsgálat elérhető legyen a páciensek számára. A szűrés elsődleges célja, hogy szükség esetén a cukorbeteg páciensek időben részesülhessenek szemészeti szakellátásban. A szűrőrendszerek leterheltsége az automatizált szűrőprogramok klinikai alkalmazását sürgetik, melyre számos informatikai megoldás született már több-kevesebb sikerrel. A klinikai gyakorlatba történő beültetésüket sokáig, a humán képolvasóhoz viszonyított gyengébb szenzitivitási és specificitási paraméterei gátolták.

A könny biomarkerek vonatkozásában DR-ban jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. Azonban ismert, hogy a szem elülső felszínét borító könnyfilmréteg számos fehérjéjének differenciált megjelenése, illetve mennyiségi változása jellemző lehet a DR-ra, illetve annak stádiumaira. A laktoferrin és a lizozim C szintek vizsgálatát említi a szakirodalom I-es típusú DM-ban szenvedő betegek mintáiban. A könnyminták laktoferrin szintje szignifikánsan nem változik, a lizozim C vonatkozásában pedig ellentmondásos adatok állnak

rendelkezésünkre. A DR előrehaladásával Kim és munkacsoportja két abundáns fehérje (lipokalin-1, HSP27) mennyiségi csökkenését írta le és ismert a β 2-makroglobulin szintjének erős növekedése is. A II-es típusú cukorbetegeken két hősokk fehérje (HSP) szintjének megemelkedését találták szignifikánsnak a könnyben; a HSP 60-at, illetve a HSP70-et azon betegeknél, akiknél minimum 8 éve áll fenn cukorbetegség.

1.5 Potenciálisan alkalmazható új szemészeti szűrőmódszerek

Az *in vivo* konfokális cornea mikroszkópia (confocal corneal microscopy, CCM) a szaruhártya élőben történő vizsgálatára alkalmas, nem-invazív módszer, segítségével a szaruhártya szerkezete a hagyományos szövettani vizsgálathoz hasonlóan tanulmányozható. A DM esetében az intenzíven vizsgált DR mellett a cukorbetegség egyéb mikrovaszkuláris ill. neuropátiás szövődményei a szemgolyó összes szövetét érintik. A szaruhártya cukorbetegség okozta érintettsége régóta ismert, de a diabéteszes keratopátia jelentősége, - részben, mint önálló kórkép, részben, mint az alapbetegség prognosztikai markere - az utóbbi években került előtérbe. A diabéteszes keratopátia jelentősége a cukorbetegség korai felismerésében, a betegség és egyes szövődményei progressziójának objektív megítélésében is felmerült.

A P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC, Dubfermline, UK) megjelenésével lehetővé vált a gyors (0,25 másodperc), nagy látószögű retinális képkészítés (200°), mely biztosíthatja az érzékeny, nehezen kooperáló betegek fundus vizsgálatát is. Számos, a retinát érintő betegség (pl.: időskori makuladegeneráció (age-related macular degeneration AMD, DR) kialakulása és kórlefolyása szempontjából, a középperiféria állapotának megítélése mellett a periférián elhelyezkedő elváltozások is kiemelkedő jelentőséggel bírnak. Ezen kórképek esetében a kezelési stratégiák kialakítása szempontjából kritikus szerepet tölthet be a retina perifériájának állapota. A perifériára lokalizálódó elváltozások vizsgálata és követése nélkülözhetetlen a kórképek etiológiájának megismerésében, vagy akár a kezelési sémák felállításában és hatásosságának megítélésében. A perifériák standard vizsgálata céljából alakították ki az ún. hét-mezőjű fotódokumentációk protokollját, melynek köszönhetően a fundus kb. 75°-os látószöge válik láthatóvá (hagyományos funduskamerák látószöge 45°-os). Mind a hagyományos funduskamerák, mind az ultraszéles látószögű lézer oftalmoszkóp megfelel a minőségi kritériumoknak, azonban az ultraszéles látószögű lézer oftalmoszkóp fundusfotóinak a területi lefedettsége jelentősen eltér (200° vs. 45°/75°), így az ultraszéles kamera diagnosztikus potenciálja magasabb lehet.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- I. Célul tűztük ki a könnyfilm plazminogén aktivátor- és inhibitor szintjeinek, valamint azok változásainak megismerését - lehetőség szerint befolyásolását - a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban. Egyfelől a leggyakrabban alkalmazott refraktív lézersebészeti (PRK és LASIK) eljárásokat követően, másfelől a szaruhártya elhúzódó sebgyógyulási folyamataiban, a kémiai sérülések esetén/ fekély képződés során. A könny proteolitikus aktivitásának mélyreható tanulmányozása révén célunk volt újabb ismeretanyagot szerezni a szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak pontosabb megértéséhez és esetlegesen új terápiás alkalmazás kidolgozásához.

1.1. Szubepiteliális lokalizációjú homályok (haze) háttérmechanizmusának tanulmányozása, indukálása és gátlása állatmodellben.

1.2. Plazminogén aktivátor inhibitorok (PAI) vizsgálata humán könnyben, jelentőségük a haze kialakulásában.

1.3. A plazminogén aktivátorok és inhibitorok változásainak tanulmányozása várandósság során.

1.4. Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és alkalmazhatóságának vizsgálata szaruhártyafekélyek gyógyításában.

- II. A cukorbetegség progressziójával megjelenő könny fehérjék és corneális sejtes, valamint idegi paraméterek azonosítása és ezek potenciális biomarkerként történő alkalmazhatósága a diabétesz szemszövődményeiben.

2.1. II-es típusú diabéteszes betegek könny fehérje-profiljának meghatározása.

2.2. Azonosított könny fehérjék szűrőprogramokban történő alkalmazhatóságának vizsgálatai.

2.3. Proteomikai vizsgálatok kombinálása képfeldolgozó algoritmusokkal DR szűrésében.

2.4. Corneális konfokális mikroszkópia és a P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp helye a diabéteszes szűrésében, beteg követésben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Refraktív célú lézersebészeti beavatkozásokkal kapcsolatos kísérletek

3.1.1 A szaruhártya refraktív lézersebészeti kezelése

PRK kezelés során a refrakciós hibák korrigálása excimer lézerkezeléssel (Keratom II ArF (193 nm) Schwind, Kleinostheim, Németország) történt 2003-ig, majd ezt követően a lézerkészülék cseréjéből kifolyólag az Inpro Argon-Fluorid excimer lézert (Intraocular Prosthetic GmbH) alkalmaztuk.

A műtét utáni kezelés: antibiotikum tartalmú szemcsepp alkalmazásával, (Ciloxan, Ciprofloxacin HCl 0,3%, Alcon) történt, mégpedig óránként az operáció első napján, melyet napi 5x-i cseppentés követett további öt napig, ami műkönny kezeléssel egészült még ki (Tears Naturale, Dextrán/Hidroxipropil Metilcellulóz, Alcon). Az első öt nap után szteroid tartalmú Flucon (Fluorometolon 0,1%, Alcon) szemcsepp és Tears Naturale műkönny használatára tértünk át. Ezeket az első hónapban napi 5x-i, a második hónapban napi 4x-i, majd a harmadik hónapban napi 3x-i cseppentés mellett alkalmaztuk. Pácienseink követése minimum 1 éven keresztül történt.

Az állatok (3,0-3,5 kg-os új-zélandi fehér nyúl) PRK kezeléseit a humán protokollt követve végeztük, azzal a módosítással, hogy az állatokon a műtéteket altatásban végeztük.

A kísérletben a haze értékelése a Hanna féle stádium beosztás szerint történt. Az értékelést végző személy nem rendelkezett előzetes ismerettel a könny uPA aktivitásáról.

LASIK kezelés során a szaruhártyalebeny (flap) készítése Hansatome Model HT 230 mikrokeratóm (Chiron) segítségével történt, lokális érzéstelenítésben a fentiek szerint ismertetett lézerkezelés szerint. A posztoperatív terápia, a PRK kezelésnél ismertetett protokoll szerint zajlott. Pácienseinket egy éven keresztül követtük, ellenőriztük.

3.1.2 Könnymintavételek és a kapcsolódó biokémiai vizsgálatok

A humán könnyminták gyűjtése, a szemhéjszél alsó marginális vonalának közelében a precorneális könnyfilmből történt, közvetlenül a refraktív sebészeti beavatkozás előtt és után, valamint az első posztoperatív kontrollok alkalmával. A PRK kezelés esetében a 3. és 5. posztoperatív napokon, LASIK kezelés esetében pedig az első posztoperatív napon. A mintavételeket ingerlés nélkül, üvegapilláris segítségével végeztük az alsó áthajlásban. A késői posztoperatív kontrollok az 1., 3., 6. és a 12. hónapban történtek mindkét műtési típus esetében, ekkor könnyminta gyűjtésére már nem került sor. Az összes mintát centrifugáltuk (1800-as fordulatszámon) közvetlenül a mintavétel után, és a felülúszót -80°C-on tároltuk

felhasználásig. Felolvasztásukra közvetlenül a méréseket megelőzően egyetlen alkalommal került sor. Kontroll mintáink esetében az operált szem mintavételeivel azonos időben és módon történt a könnyminták gyűjtése.

Az *állati* (3,0-3,5 kg, új-zélandi fehér nyúl) *könnyminták gyűjtése* ingerléssel történt, i.m. pilokarpin hidroklorid (5 mg/kg) alkalmazásával a fentiekben ismertetettek szerint.

Az *uPA aktivitásának meghatározása* a könnyből spektrofotometriás módszerrel történt, humán plazminogén és plazmin-specifikus kromogén peptid szubsztrát felhasználásával. Az uPA aktivitás és plazminszerű aktivitás meghatározását Shimada és munkatársai módszerének módosításával végeztük, a következők szerint: 5 µl könnyet, standard urokinázt vagy plazmint inkubáltunk 37°C-on 100 µl 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,4), 0,5 mM S-2251 kromogén szubsztrát (D-Val-L-Leu-L-Lys-p-nitroanilid) és 1 µM humán plazminogén jelenlétében. Mintáinkat 4 óra inkubálás után 405 nm-en fotometráltuk (Multiscan MS, Labsystem, Helsinki, Finland). A könnyminták uPA aktivitásának a meghatározása urokináz hígítási sor alapján készített logaritmikus diagram alapján történt.

A könny *PAI-1 és PAI- 2 mennyiségének a meghatározásához* enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatot (ELISA/Immubind ELISA, American Diagnostica GmbH) végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően. A módszer mind a szabad, mind a proteáz-kötött formák kimutatására alkalmas.

3.1.3 Állatkísérletek a haze tanulmányozására és a kapcsolódó biokémiai vizsgálatok

3.1.3.1 Állatmodell a haze indukálására és gátlására, a várandósság, mint rizikófaktor

Állattanulmányunkba 30 egészséges állatot (új-zélandi fehér nyúl) vontunk be, melyből 27 állat mindkét szemén PRK kezelést végeztünk - altatásban, 6,0 dioptria (D) miópiás korrekciónak megfelelően -, három állatot nem operáltunk annak érdekében, hogy egészséges kontrollként szolgálhassanak a kísérlet folyamán. Az operált állatok közül 9 volt vemhes. A PRK kezelés követő első hét posztoperatív protokollját az 1. táblázat szemlélteti.

Az állatok uPA terápiája, a PRK kezelés humán protokolljának megfelelően zajlott az alábbiakban részletezett módosítással, mely szerint az alkalmazott antibiotikum - Ciloxan (Ciprofloxacin HCl 0,3%, Alcon) - 50 IU/ml uPA-t (Ukidan, Serono SpA; Unterschleissheim, Germany) is tartalmazott az első posztoperatív hét kezelése során. Ezt követően az állatok posztoperatív terápiája mindkét szem esetében a humán protokollal egyezett meg.

Az állatok aprotinin kezelése a PRK humán protokollja szerint zajlott az alábbiakban részletezett módosítással, mely szerint az alkalmazott antibiotikum - Ciloxan (Ciprofloxacin

HCl 0,3%, Alcon) - mellett egy csepp 10.000 KIU/ml aprotinin (Gordox, Richter Gedeon Rt., Budapest) alkalmazására is sor került az első posztoperatív hét folyamán. Ezt követően az állatok kezelése mindkét szem esetében a humán protokollnak felelt meg.

Csoport	Vemhesség	Szem (db)	Könnyminta
Aprotinin kezelés +	-	2	+
Aprotinin kezelés +	+	1	+
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	-	2	+
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	+	1	+
Nem operált kontroll	-	6	+
uPA kezelt	-	16	-
uPA kezelt	+	8	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	-	16	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	+	8	-

1. táblázat A PRK kezelést követő első posztoperatív hét kísérleti protokollja.

Aprotinin kezelés +: a humán protokoll [Ciprofloxacin HCl 0,3% és Dextrán/Hidroxipropil Metilcellulóz] a kezelések alkalmával egy csepp 10.000 KIU/ml aprotininnal egészült ki. Aprotinin kezelés -: humán protokoll szerint. uPA kezelt: a humán protokoll szerint alkalmazott antibiotikum 50 IU/ml uPA-t is tartalmazott. uPA nem kezelt: a humán protokollal megegyezett.

3.1.3.1 Az urokináz típusú plazminogén aktivátor expressziójának meghatározása

A széles szubsztrát specificitású szerin proteáz inhibitor az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozására tervezett állatkísérletünk során 22 állat (új-zélandi fehér nyúl) mindkét szemét operáltuk PRK kezeléssel; 3,0 D miópiás korrekciónak megfelelően. Az állatok egyik szemét a humán protokollnak megfelelően kezeltük (kontroll szem), a másik szem kezelését pedig a fentiekben részletezett aprotinin kezeléssel egészítettük ki. Az állatokat a kezelést követő különböző időpontokban - 2 és 4 óra, 1 és 3 nap elteltével - altattuk túl és mindkét szemet enukleáltuk.

A szaruhártyák trepanálását követően a corneákat megfeleztük, melyek egyik feléből RNS izolálást követően az uPA mRNS mennyiségét határoztuk meg, reverz transzkripció utáni valós idejű kvantitatív PCR technikával (qPCR), a másik felének felhasználásával pedig fagyasztás utáni metszeteken *in situ* zimográfiát végeztünk, annak érdekében, hogy a

sebgyógyulás során megjelenő uPA kifejeződés helyét tanulmányozzuk és meghatározzuk a kialakult uPA aktivitás mértékét.

3.1.4 Humán vizsgálatok

3.1.4.1. A plazminogén aktivátor inhibitor szintek meghatározása refraktív lézersebészeti beavatkozások során

A PAI-1 és PAI-2 szintjeit humán könnymintákban vizsgáltuk, PRK és LASIK kezelés előtt és után a korai posztoperatív időszakban. Tanulmányunkban PRK kezelés 46 szemén történt (38 páciens, 8 esetben kétoldali kezelés, átlagéletkor 26 ± 5 év), míg LASIK kezelést 13 szemén végeztünk (8 páciens, 5 esetben kétoldali kezelés, átlagéletkor 28 ± 9 év). Statisztikailag szignifikáns különbség a csoportok között nem volt ($p=0,535$ t-teszttel) kimutatható. A PRK kezelés esetén a műtét előtti refrakciós hiba átlag értéke $-4,11 \pm 2,22$ D, míg LASIK kezelés esetében $-5,13 \pm 1,89$ D volt. Az átlag ablációs mélység a PRK csoport esetében 48 ± 20 μm , a LASIK csoportnál 59 ± 13 μm volt. Statisztikailag szignifikáns különbség az ablációs mélységben a csoportok között ($p=0,074$ t-teszttel) nem volt.

A könnyminták PAI-1 és PAI-2 mennyiségének meghatározására enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatot végeztünk: PRK típusú lézerkezelés esetében 61 könnyminta PAI-1 és 146 könnyminta PAI-2 mennyiségének meghatározása történt. LASIK kezelés esetén 35 könnymintában határoztuk meg a PAI-2 szintjeit, PAI-1 meghatározás nem történt.

3.1.4.2 Plazminogén aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok várandósság során

A PAI-1 és PAI-2 szintek, valamint az uPA szint meghatározására irányuló vizsgálatainkat várandós egészséges, 19-33 (átlag: $27,42 \pm 4,13$) év közötti önkéntesek bevonásával végeztük. Vizsgálataink során bármely szemészeti megbetegedést, kontaktlencse viselést, illetve gyógyszer szedését kizáró oknak tekintettük. A könnyminták gyűjtése a terhességi trimesztereknek megfelelő szülészeti kontrollok alkalmával történt, valamint a gyermek megszületését követő 1 héten.

Könnymintáink vizsgálatai során 19 várandós betegünk 56 könnymintáját analizáltuk PAI-2 szint meghatározás vonatkozásában. További 13 várandós nőtől gyűjtött 45 könnyminta esetén történt PAI-1 aktivitás mérés. Kontrollként (45 páciens), korban illesztett nem várandós nő könnymintáiban történt PAI-1 és PAI-2 szintek meghatározás, ELISA módszerrel.

A vizsgálni kívánt hormonszinteket (ösztadiol (E2) és progeszteron (P4)) mind a könnyből mind a vérből meghatároztuk. A vérminták gyűjtésére a könnymintavételekkel egyidőben került sor, 17 várandós páciensünk (51 minta) esetében.

A PAI-1 és PAI-2 szinteket vérplazmából ELISA módszerrel határoztuk meg, összesen 25 várandós páciensünk 87 mintájában végeztünk PAI-2 és 10 páciensünk 20 mintája esetén PAI-1 meghatározást.

Várandós pácienseink könny uPA szintjének vizsgálati felépítését 2. táblázatban szemléltetjük.

	Nem várandós páciens	9 - 12 terhességi hét	14 - 23 terhességi hét	25 - 39 terhességi hét	Szülést követő 1 hét
Átlagéletkor	28,7	34,2	32,6	30,1	32,1
Átlagtól való eltérés (SD)	7,9	5,7	4,5	4,9	5,4
Legidősebb életkor	46	42	39	42	39
Legfiatalabb életkor	17	19	23	21	23
Résztvevők száma	18	19	30	24	10

2. táblázat. A vizsgálatba bevont nők száma, életkora az egyes terhességi korok függvényében.

Tanulmányunkban 104 mintavétel történt, melyből 3 mérés eredménye került kizárássra kiugróan eltérő értékei miatt. A minták normális eloszlását és ekvivalenciáját megvizsgáltuk és az alábbi statisztikai analízist végeztük el: t-tesztek, medián tesztek, khi-négyzet eloszlás alkalmazása, Yates-korrekción, Mann-Whitney U-tesztek és variancia analízisek.

3.1.4.3 Statisztikai analízisek a refraktív lézersebészeti beavatkozásokkal kapcsolatosan

A szaruhártya refraktív lézerkezelését követő sebgyógyulási folyamat során, az uPA aktivitás változásának elemzésére (állat és humán), továbbá várandós páciensek különböző mintavételi szakaszaiban történt könnyminták PAI változásának elemzésére standard statisztikai analízist végeztünk. A különböző betegcsoportok összehasonlítására egyenlő varianciákra alkalmazott t-tesztet használtunk, a kontroll csoportokkal való összevetés pedig párosított t-teszt alapján történt. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket akkor, ha $p < 0,05$ és kifejezett szignifikanciáról beszéltünk, ha $p < 0,001$. Az egyes kísérletekben, a fentiektől esetlegesen eltérően alkalmazott statisztikai elemzési módszerek a kísérlet leírásához tartozó alfejezetekben kerülnek ismertetésre.

3.1.5 Szaruhártyafekély képződéséhez kapcsolódó kísérletek

3.1.5.1 Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 előállítása

A fúziós fehérje előállítása során egy olyan vektor konstrukciót alkalmaztunk, amely kettős segítő - fehérje/peptid - szekvenciát is tartalmaz. A termeltetett fúziós fehérje N-terminális részén (amely jelen esetben a PAI-2) hexahisztidin szekvencia (His6-tag) helyezkedik el, melyet maltóz kötő fehérje-szekvencia (MBP) követ. Az MBP, His6-tag és a PAI-2 szekvencia közé dohánymozzaik vírus (TEV) proteáz hasítási helyet klónoztunk be, így a fúziós fehérje egy proteolitikus hasítással a segítő - fehérje/peptid leválaszthatók.

3.1.5.2 Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 aktivitása

A fent ismertetett módon előállított fehérje urokináz gátló aktivitását mikrotiter lemezes módszerrel ellenőriztük. Az aktivitásméréshez használt oldat összetevői a következők voltak: 140 µl puffer (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,5), 20 µl 3 mM piro-Glu-Gly-Arg-pNA kromogén szubsztát (S-2444, Chromogenix), 20 µl 700 IU/ml uPA (Choay). Ehhez az elegyhez 20 µl tisztított rekombináns PAI-2 fehérjét (illetve kontrollként desztillált vizet) adtunk. Az uPA aktivitását előzőleg S-2444 szubsztáttal kalibráltuk. A reakcióelegyet inkubáltuk, majd a hasított szubsztáthoz köthető színváltozást 405 nm-en Labsystems Multiskan MS mikrolemezes leolvasóval detektáltuk.

A rekombináns PAI-2 fehérje aktivitását SV-40-transzformált humán corneális epitél sejtek (HCE-T, mely Kaoru Araki-Sasaki ajándéka, az Osaka University, School of Medicine, Osaka, Japan, a Riken Cell Bankon keresztül) tenyészetén is ellenőriztük.

3.1.5.3 Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása állatmodellben

A rekombináns PAI-2 fehérje tartalmú szemcsepp tanulmányozására 6 db kísérleti állaton kémiai sérülést idéztünk elő. A sérülést, mindkét szem 6 mm-es átmérőjű, 0,5 M nátrium-hidroxid (NaOH) oldattal átitatott szűrőpapír korongnak 20 másodpercig a corneához történő érintésével váltottuk ki. A sérülés indukálását követően a corneát és a kötőhártya zsákot a lág maradéktalan eltávolítása céljából fiziológiás sóoldattal öblítettük, melyet lakmuspapírral ellenőriztünk. Ezután mindkét szemet különbözőképpen kezeltük. Az állatok kontroll szemét antibiotikumot (Ciloxan, Alcon) tartalmazó szemcseppel kezeltük 5x-i cseppentéssel naponta, az ellenoldali szem kezelésére Ciloxan szemcseppben oldott, 5 IU/ml uPA ekvivalens rekombináns PAI-2 fehérjét használtunk naponta 5x-i cseppentés mellett.

A szemcsepp dózisének megállapításához meghatároztuk az uPA aktivitást a fentiekben ismertetett kromogén szubsztrátos módszerrel kémiai sérülés utáni, inhibitorral nem kezelt nyúl szemből nyert könnymintákban.

3.2 A cukorbeteg diabéteszes retinopátiájához kapcsolódó vizsgálatok

3.2.1 Diabéteszes retinopátiára jellemző könnyfehérjék azonosítása

Tanulmányunkba 119 rendszeresen gondozott cukorbeteg (II-es típusú DM) páciensünk került bevonásra; a nemzetközi standardoknak megfelelően, szemfenéki elváltozásai alapján három csoportba kerültek besorolásra: i) normál szemfenéki kép, ii) nem proliferatív diabéteszes retinopátia és iii) proliferatív diabéteszes retinopátia. A kontroll egészséges csoportot 26 önkéntes medikushallgató képezte. A könnymintavétel a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt. A diabéteszes betegek egyedi könnymintáit a 26 egészséges önkéntestől gyűjtött könnyminta-keverékkel ("poolozott minta") vetettük össze.

A könnyminták fehérjetartalmának meghatározásához Bradford módszert használtunk (BioRad). A begyűjtött könnyminták kémiai jelölését (iTRAQ 4plex) végeztük el az ABSciex (Framingham, MA, USA) gyártó utasításai alapján.

A kromatográfiás elválasztáshoz a mintákat Zorbax 300SB-C18 oszlopra (Agilent, Santa Clara, CA, USA) injektáltuk 200 perces acetonitril/víz gradienst alkalmazva, ahol fokozatosan növeltük az acetonitril koncentrációját 0%-ról 30%-ra. Az "A" oldószer 2% acetonitrilt és 0,1% hangyasav vizes oldata volt, míg a "B" oldószer 2% víz 0,1% hangyasav acetonitriles oldatából állt. A vizsgálat során 300 nl/perc-es volt az áramlási sebesség.

LC-MS/MS analízist végeztünk nano HPLC-vel (Agilent 1100 series) kapcsolt 4000 QTRAP (ABSciex, Framingham, MA, USA) tömegspektrométer segítségével, NanoSpray II MicroIon forrás használatával.

A tömegspektrometriás adatokat ProteinPilot 2.0.1. (ABSciex) szoftverrel elemeztük, a UniProtKB / Swiss-Prot adatbázis használatával. A fehérje azonosításhoz a szoftverbe épített Paragon módszer ProGroup algoritmusát használtuk. A fehérjék kvantitálása ugyancsak a ProteinPilot 2.0.1. szoftverrel történt; a 114, 115, 116, illetve 117-es jelölő anyagok görbe alatti területeiből az azonosított fehérjék egymáshoz viszonyított, relatív mennyiségét határoztuk meg. Az adatok értékelésénél csak a szoftver által számolt szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket vettük figyelembe.

Az adatokat normalizálást követően elemeztük statisztikailag. Az összehasonlításához SPSS 15.0 szoftvert (SPSS Inc. Chicago, USA) használtuk, valamint a nem-paraméteres Mann-Whitney U-tesztet. A részletesebb adatelemzés érdekében GeneSpring 7.3 szoftvert (Agilent

Biotechnologies) használtuk, mely során a legalább kétszeres változást mutató fehérjét vettük számításba. A lehetséges azonosított biomarkerek hasznosságának megállapításához ROC (Receiver Operating Characteristic Curve, ROC elemzés, különböző tesztek szenzitivitásának és specificitásának összehasonlítására alkalmas ábrázolási módszer) analízist végeztünk.

3.2.2 Tanuló algoritmusok alkalmazhatósága a diabéteszes retinopátia szűrésében

A könnyminták fehérje tartalmának tanuló algoritmussal történő vizsgálatára az előző fejezetben ismertetett, a diabéteszes retinopátiára jellemzően azonosított könnyfehérjét használtuk.

A DR diagnózisának és stádiumának beosztása az ún. 7-mezős fundusfotókon alapult. A képek elemzését és a DR stádium szerinti besorolását két egymástól független szemész szakorvos végezte. A fundusfotók képfeldolgozási módszertannal történő vizsgálata során, a tanulóalgoritmusokat alkalmazó modell bemeneti információit a képfeldolgozó eljárással vizsgált fundusfotókon azonosított MA-ák száma adta, kimenetét a „van DR”, illetve „nincs-DR” kategóriákba történő besorolása jelentette. A modellalkotás során 6 különböző optimálisan parametrizált gépi tanuló eljárást hasonlítottuk össze: Support Vector Machine (SVM), Recursive Partitioning (Rpart), Random Forest (randomForest), Naive Bayes (naiveBayes), Logistic Regression (logReg), K-Nearest Neighbor (k-NN).

A kombináción alapuló tanuló algoritmusok fejlesztéséhez vizsgálatunk során háromféle automatizált monitorozó rendszert fejlesztettünk és teszteltünk tanulmányunkban. Röviden ismertetve: i) a könny fehérje multimarkerek értékelése; ii) digitalizált retinaképeken jelenlévő MA-k detektálásán alapuló algoritmusok alkalmazása; iii) kombinált módszer alkalmazása, mely a fent említett két módszer ötvözte.

Kombinált monitorozási módszerünk tesztelésére összesen 52 II-es típusú cukorbeteg páciensünk 74 szemét vontunk be vizsgálatunkba. Az informatikai modell felépítéséhez és teszteléséhez az ún. 7-mezős fundusfotókat, és a fotódokumentációval ugyanazon időben vett könnymintákat alkalmaztuk. A vizsgálatba bevont 74 szemből 56 esetben voltak megfigyelhetőek a DR jelei.

3.2.3 Potenciálisan alkalmazható új szűrőmódszerek a szemészetben

3.2.3.1 In vivo konfokális cornea mikroszkópia

Első vizsgálatunkba I-es típusú cukorbetegségben szenvedő 28 betegünk (átlag életkor: $22,86 \pm 9,05$ év) és 17, korban illesztett kontroll, egészséges fiatal (átlag életkor: $26,53 \pm 2,43$ év)

került bevonásra. Második, 2 éves követéses tanulmányunk során a korábbi 28 beteg közül 19 páciens esetében ismételtük vizsgálatainkat. A kontrollcsoport, mind általános mind szemészeti szempontból teljesen egészséges volt és egyik csoportban sem volt kontaktlencse viselő, vagy előzőleg szemészeti beavatkozáson átesett páciens. Az első vizsgálat során az I-es típusú DM-ban szenvedő betegeinket további két csoportra osztottuk: DR-ban nem szenvedő és DR-ban szenvedők csoportjára. A követéses tanulmány során 12 beteg DR-ban nem szenvedett, 7 páciens DR-ban szenvedett.

A státusz felvételt követően végeztük el a CCM vizsgálatot, pácienseink mindkét szemén, Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT III RCM, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) alkalmazásával, helyi érzéstelenítésben. A Heidelberg HRT-III mikroszkóp segítségével a cornea centrumának részleteit dokumentáltuk. Analízisre a normál kontrollok és a DR-ban nem szenvedő pácienseink jobb szemének vizsgálati eredményei kerültek. A DR-ban szenvedő pácienseink esetében az érintett szem került bevonásra. A bazális epitéliumnak a Bowman membrán előtti, a poszterior strómának a Descemet membrán előtti három-három éles szelet felelt meg. További összehasonlító vizsgálatainkhoz a kiválasztott képek eredményeinek átlagait használtuk.

Vizsgálataink során a sejtszám meghatározásokat a műszer biztosította szoftverrel végeztük, félautomata sejtsűrűség meghatározással. Az epitélium, a keratocita és az endotél sejteket az érdekelt területből választottuk ki, amely legalább 50 darab sejtet tartalmazott. Ezt követően a sejteket manuálisan jelöltük ki, melyekből a szoftver automatikusan kalkulálta ki a sejtsűrűséget (sejt/mm²). A subbazális idegi plexus morfológiájának meghatározására automata analízáló szoftvert alkalmaztunk (ACCMetrics, University of Manchester, Manchester, UK). Az alábbi paraméterek kerültek kvantifikálásra: az idegrost sűrűsége (Nerve Fibre Density, NFD) - az idegrostok száma/mm²; az idegelágazódások sűrűsége (Nerve Branch Density, NBD) - az elsődleges elágazódási pontok a fő idegroston/mm²; az idegrostréteg hossza (Nerve Fibre Length, NFL) - az idegrostok teljes hosszúsága mm/mm²; idegrost teljes elágazódások sűrűsége (Nerve Fibre Total Branch Density, TBD) - elágazódási pontok teljes száma/mm²; idegrost területe (Nerve Fibre Area ,NFA) - az idegrostok teljes területe mm²/mm²; idegrostok szélessége (Nerve Fibre Width, NFW) - átlagos idegrost szélesség mm/mm².

Leíró statisztika alkalmazásával határoztuk meg az eredményeink átlagát, szórását (SD) és a 95%-os megbízhatósági tartományt (confidence interval, CI). A statisztikai analíziseket MedCalc szoftver 10.2.0 és SPSS szoftver 13.0 verziójával végeztük el. A 3 csoport eredményeinek összehasonlítására varianciaanalízist, és post-hoc Tukey-tesztet alkalmaztunk.

A folytonos változók vizsgálatára Student-féle t-tesztet használtunk két csoport összehasonlításánál, valamint az egyváltozós paraméterekre χ^2 -próbát alkalmaztunk. A kétváltozós paraméterekre Pearson korrelációt használtunk. Minden esetben $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

3.2.3.2 P200C AF pásztázó ultraszéles látószögű lézer oftalmoszkóp

Munkacsoportunk a hagyományos 45° kamerával készült fundusfotókat vetette össze a P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC, Dubfermline, UK) kamerájának azonos beteganyagon készített képeivel, az utóbbi készülék validálása érdekében. A képalkotó eljárásokat a makula vonatkozásában hasonlítottuk össze, az AMD és az időskori makulopátia (ARM) patológiás eltérésein keresztül. Összehasonlító vizsgálatainkat nagy betegszámmal kívántuk elvégezni, ezért AMD-s betegek fotódokumentációját alkalmaztuk, mert ilyen jelentős esetszám diabéteszes betegek vonatkozásában nem állt rendelkezésünkre. A DR-ban elsőként megjelenő fundusképi elváltozás a MA (10-100 μm), az AMD-ben megjelenő drusen méretével jól korrelál (kemény drusen $< 63 \mu\text{m}$, a közepes méretű drusen méret 63-125 μm). Az AMD-s beteganyag alkalmazása a fentiek ismeretében megfelelő választás lehet a MA-k ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóppal történő detektálhatóságának a megítélésében (is).

Vizsgálatainkat a "Reykjavík Eye Study" keretein belül végeztük; 451 páciens esetében készült fundusfotó-dokumentáció két képalkotó eljárással. Tanulmányunkba 121 szem került beválogatásra, az AMD elváltozásainak teljes spektrumának lefedésével. A fundusfotók elemzése, az Optos V2, DX elemző szoftverével történt mindkét eljárás esetében.

Az elváltozások méreteinek a meghatározása számítógép asszisztált standard körök felhelyezésével történt. Analízisre az ARM-hez vagy AMD-hez kapcsolódó elváltozások kerültek. Az elváltozások fenotípusainak meghatározása a Nemzetközi Klasszifikáció szerint történt. Az alábbi elváltozások kerültek azonosításra: kemény és puha drusen, geografikus atrófia (geographic atrophy, GA) és chorioretinális neovaszakularizáció (chorioretinal neovascularisations, CNV). További, részletes képelemzésre került sor kemény drusen, GA és CNV, valamint puha drusen vonatkozásában (21 szem), mindkét képalkotóval. A drusenek elemzése - a drusen individuális megjelölésével zajlottak, típus és méret szerinti. Részletes elemzésre kerültek továbbá a retinális pigment epitel (RPE), a CNV és GA típusú elváltozások az utóbbi kettő méretének megadásával.

A képelemző önmagához és más képelemzőhöz viszonyított egyezésének megítélése érdekében k-statisztikát végeztünk. A statisztikai analízisek a Stata 9.0 (STATA Data analysis and Statistical Software, TX, USA) segítségével történtek.

4. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

4.1 Könnyenzimek tanulmányozása a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban

4.1.1 Állatmodell alkalmazása a haze hatásmechanizmusának megismerésére, indukálására és gátlására; a vemhesség, mint rizikófaktor.

Refraktív lézerkezelést követő corneális sebgyógyulási folyamatokat vemhes és nem vemhes állatokon tanulmányoztuk, tekintettel arra, hogy a vemhesség alatt ismert a PAI-ok plazma koncentrációinak emelkedése.

A PRK kezelést követően alkalmazott posztoperatív kezelési protokollokat és a késői posztoperatív időszakban kialakult haze stádiumait a könnyebb áttekinthetőség érdekében összefoglalóan szemlélteti a 3. táblázat.

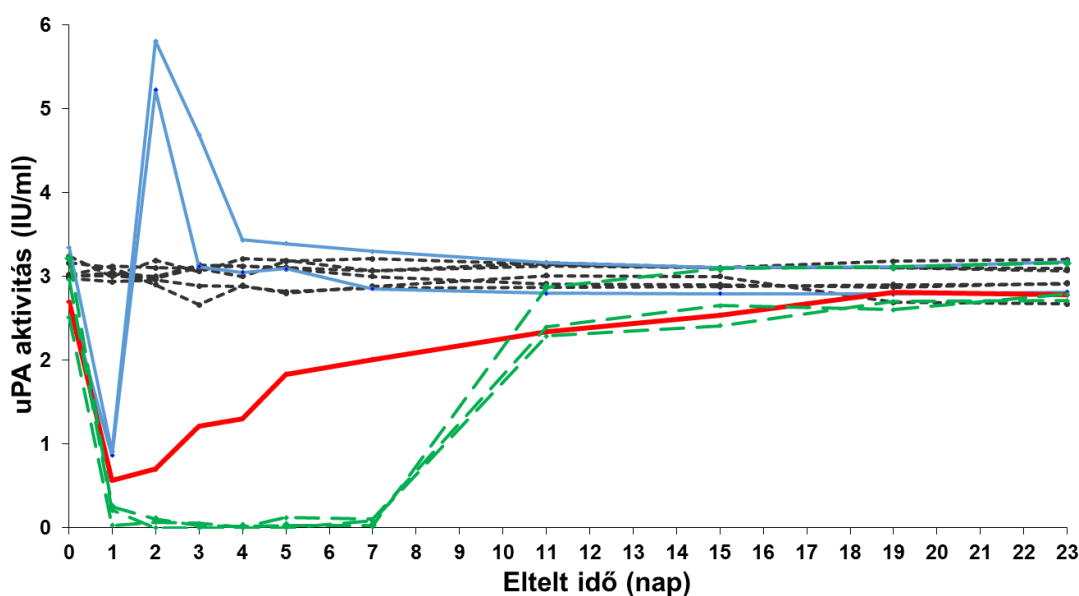
Csoport	Haze (Hanna)					
	Vemhesség	Szem (db)	Könnyminta	1 hó	3 hó	6 hó
Aprotinin kezelés +	-	2	+	-	2	2
Aprotinin kezelés +	+	1	+	-	2	3
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	-	2	+	-	-	-
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	+	1	+	2	2	2
Nem operált kontroll	-	6	+	Nem értelmezhető		
uPA kezelt	-	16	-	-	-	-
uPA kezelt	+	8	-	-	-	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	-	14	-	-	-	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	-	2	-	+	1-2	1-0
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	+	1	-	-	-	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	+	7	-	+	1-2	0,5-1

3. táblázat A PRK kezelést követően kialakult haze az alkalmazott kezelések vonatkozásában. Az első posztoperatív hét terápiája;

Rövidítések jelentése: Aprotinin kezelés+: a humán protokoll plusz egy csepp 10. 000 KIU/ml aprotininnal egészült ki a kezelések alkalmával. Aprotinin kezelés-: humán protokoll szerint. uPA kezelt: a humán protokoll szerint alkalmazott antibiotikum 50 IU/ml uPA-t is tartalmazott. uPA nem kezelt: humán protokoll szerint.

Az állatok humán protokoll szerint történő kezelése esetében, könnymintáik uPA aktivitás értékeinek változása megfelelt, a humán könnymintákban korábban megfigyelt uPA aktivitási értékek változásainak a korai posztoperatív időszakban. Részletezve, az alábbi változásokat detektáltuk: uPA aktivitás szignifikáns csökkenése az első posztoperatív napon, szignifikánsan emelkedés a 2. posztoperatív napon, preoperatív szintre történő visszaesés a 3-4. posztoperatív napokra, melyet követően szignifikáns változás már nem volt kimutatható (2. ábra).

Szerin proteináz inhibitor (aprotinin) alkalmazása, az első posztoperatív hét folyamán alkalmasnak bizonyult az állatok könnyében mért uPA aktivitás értékeinek visszaszorítására. Az aprotininnal kezelt állatszemek esetében, haze kialakulása volt megfigyelhető minden egyes esetben a késői posztoperatív időszakban. Vemhes állat könnymintáinak vizsgálata során, az aprotinin kezeléshez hasonlóan alacsony uPA aktivitási értékek voltak detektálhatóak a könnyfilmben (2. ábra).



2. ábra Az uPA aktivitás időbeli változása PRK műtétet követően nyulak könnymintáiban.

Szaggyatott zöld vonal: aprotinin kezelés +, nem vemhes állat; Vékony kék folytonos vonal: aprotinin kezelés -, nem vemhes állat; Vastag folytonos piros vonal: aprotinin kezelés -, vemhes állat; Pontozott fekete vonal: kontroll szem, nem operált.

Az uPA szemcsepp alkalmazása megakadályozta a haze kialakulását a PRK kezeléssel átesett állatszemeken (100%), ezzel szemben az ellenoldali, uPA-val nem kezelt szemek esetében 12,5%-nál alakult ki subepiteliális homály. Állatkísérletünk eredményei alátámasztják, hogy a vemhesség kockázati tényezőként szerepel a posztoperatív haze kialakulásában, vemhes nyulaink esetében 49-es esélyhányadossal növelve a kockázatot nem vemhes társaikhoz viszonyítva. A humán protokoll mellett alkalmazott uPA kezelés

(szemcsepp formában) profilaktikusan hatékony terápiának bizonyult állatmodellünkben a késői posztoperatív időszakban esetlegesen kialakuló haze megelőzésére.

Humán pácienseink és állatmodelljeink könnymintáit tanulmányozva a 2-3. posztoperatív napon mért uPA aktivitás értékei, valamint a későbbiekben esetlegesen kialakuló haze szoros korrelációt mutatott. A korai posztoperatív időszakban a könnyben mért alacsony uPA aktivitási értékek összefüggtek a haze későbbi kialakulásával. Állatokon végzett kísérleteink egyrészt bizonyították, hogy szerin proteináz inhibitor alkalmazásával haze indukálható; másrészt, hogy a haze kialakulása tekintetében fokozott kockázattal rendelkező vemhes nyulak esetében az alkalmazott uPA kezelés a poszt-PRK subepiteliális homály előfordulását jelentős mértékben csökkenti. Állatkísérleteink alapján a vemhes nyúl hasznos modell lehet a haze kezelésére alkalmas hatóanyagok, valamint a kezelés hatékonyságának vizsgálatára a PRK kezelést követően. A vemhes állatok PRK kezelése során a haze alacsony ablációs mélység alkalmazása esetében is kialakul (-3,0 D).

Kísérleteink eredményei alapján valószínűsíthető, hogy az uPA fiziológiás szintjének megemelkedése a könnyben, segít a posztoperatív időszak sebgyógyulási folyamatában fenntartani a szaruhártya transzparenciáját és az uPA lokális szemcsepp formában történő alkalmazása kompenzálja a teljes kiürülést ezen időszak alatt. A fentiekből arra következtethetünk, hogy az uPA lokális alkalmazása a korai posztoperatív időszakban segíthet a késői posztoperatív időszakban esetenként kialakuló haze mérséklésében és/vagy megakadályozásában. Ismert, hogy a megfelelő dózisban alkalmazott uPA kezelés nem gyakorol káros hatást a szaruhártyára. Tekintettel arra, hogy a haze kialakulása előre nem jelezhető, ezért a páciensek profilaktikus alapon történő kezelése is mérlehelhető lehet.

4.1.2 Az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozása állatmodellben

Az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozása érdekében állatmodellben vizsgáltuk az urokináz gátló hatást egyrészt mRNS szinten qPCR módszerrel, másrészt aktív fehérje megjelenésének szintjén *in situ* zimográfiával.

A PRK kezelés során kétféle Hoffer trepánt alkalmaztunk az epitél sejtek eltávolításához. A 7 mm átmérőjű trepán alkalmazásával eltávolított epitelális sejtrétegekben, a csak antibiotikumos szemcseppet kapó kontroll állatok szaruhártyájában mért uPA mRNS relatív mennyisége alacsony volt 2 órával a műtét után, azonban jelentős mértékű színtemelkedést figyeltünk meg a műtétet követő 4. és 24. órában. Az uPA expresszió változása eltérő volt abban az esetben, amennyiben módosítottuk az alkalmazott trepán méretét. Az epiteliális sejtréteg eltávolításához használt 6 mm-es átmérőjű trepánnal kapott eredményeink

a műtét után 2 órával gyűjtött kontroll minták esetén jelentősen megemelkedett uPA transzkripciót mutattak. Az uPA szint körülbelül ötödére csökkent műtét után 4 órával és tovább csökkent 24 óra elteltével.

Minden minta, mely aprotinin tartalmú antibiotikum szemcseppel kezelt szemből származott, a műtét után 4 órával jelentős uPA mRNS csökkenést mutatott az aprotininnel nem kezelt kontrollokhoz képest. 7 mm-es trepán alkalmazása esetén, a kontroll és az aprotininnel kezelt szemek uPA szintje a műtét utáni 2. órában volt összehasonlítható mértékű. 6 mm-es trepán alkalmazása esetén, amennyiben a műtétet közvetlenül követően, az állat szemét egy csepp aprotininnel kezeltük, az uPA szint 2 óra elteltével a kontroll értékek 60%-ára esett vissza.

A 6 mm-es trepánnal operált állatszemek esetében, a lefagyasztott szaruhártya darabokat *in situ* zimográfiának vetettük alá. Miközben plazminogén-független lízist nem tudtunk megfigyelni, a plazminogén függő kazeinolízis az epitéldefektus helyére korlátozódott, és sokkal hangsúlyosabban jelent meg a vándorló epitélium elülső szegélyén. A szaruhártya-minták uPA aktivitásának megállapításához a lízis zónák teljes képanalízisét végeztük, és az aprotininnel kezelt minták esetében jelentős csökkenést figyeltünk meg.

A kazeinolízist az *in situ* zimográfia során a poliklonális anti-uPA antitest részlegesen, míg az amilorid, - amely egy specifikus uPA inhibitor - teljes egészében képes volt gátolni. Ugyanakkor, poliklonális anti-tPA antitestet alkalmazva gátlást nem figyelhettünk meg, tehát a kazein hidrolízise bizonyítottan az uPA aktivitásnak volt köszönhető.

A nyúl vs. humán könnyminták magasabb normál uPA értékei ellenére, elfogadott állatmodell a szaruhártya és a szem elülső szegmensének proteolitikus eseményei tanulmányozására, a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban. Kísérleteink láncolatában, a nyúlmodell igen hasznos volt humán eredményeink igazolásában és a sebgyógyulás folyamán bekövetkező uPA aktivitás változásainak, valamint a szaruhártya sebgyógyulási folyamataival kapcsolatos korrelációk tanulmányozásában. *In situ* zimográfiás tanulmányaink alátámasztották az uPA kifejeződését az epiteliális defektusoknál, az irodalomban leírtaknak megfelelően. Kvantitatív PCR segítségével bizonyítottuk, hogy a PRK kezelést követő sebgyógyulás során az aprotinin csökkenti az uPA expressziót transzkripciós szinten (is). Szaruhártya metszeteken *in situ* zimográfiával a sebgyógyulás korai szakaszában kimutattuk a csökkent uPA aktivitást. Érdekes, hogy a természetes plazminogén aktivátor inhibitor-2 (PAI-2) mennyiségének növekedését figyeltük meg a humán könnyben közvetlenül a PRK és a LASIK kezelések után, de a PAI-2 szintek visszatértek a normális preoperatív szintekre a műtétet követő első posztoperatív napon.

A teljes lízis zónák képelemzése az uPA mRNS az aktivitással hasonló mintázatot mutat, az idő előrehaladtával pedig az uPA szint csökkenése figyelhető meg PRK kezelést követően. Ugyanakkor, az uPA mRNS relatív mennyisége a kontroll minták esetében jelentősen csökken 24 óra elteltével, míg az uPA aktivitás mértéke ekkor még jelentős. Azt feltételezzük, hogy ez a körülbelül egy napos időeltolódás és az aktivitás a már meglévő, aktív és még nem degradálódott uPA az mRNS szintjének köszönhető. A 7 mm-es trepánnal kezelt szemek esetében az uPA mRNS szintje a műtét utáni 24. óráig növekszik, ugyanakkor csökkenő tendenciát mutat a 6 mm-es trepánnal kezelt szemeknél. Nem egyértelmű a magyarázat erre a különbségre. Tanulmányunkban, a két különböző átmérőjű trepán alkalmazását összevetve (6 mm/7 mm) az eltávolított epitel területének a vonatkozásában 36%-os különbség volt tapasztalható.

Korábbi munkánkban a könny uPA aktivitás mérései bizonyítékul szolgáltak az uPA aprotinin által történő gátlásához. Ez lehetett egyrészt az aprotinin uPA molekulákkal történő gátló interakciók eredménye, másrészt az uPA mRNS szint indirekt modulációja a transzkripció gátlás miatt, vagy az uPA mRNS stabilitásának megváltoztatása miatt. A kvantitatív PCR eredmények kimutatták, hogy az aprotinin csökkenti a szaruhártyában az uPA mRNS szintet, és ezáltal csökkenhetett az uPA aktivitás a könnyben és a vizsgált szaruhártya metszeteken. Ezt a hatást inkább gén szuppresszió eredményének tulajdonítjuk, mint közvetlen uPA gátlásnak. A kisebb uPA termelés további következménye az uPA-plazminogén-plazmin enzim rendszer csökkent aktivitásának. Megállapításaink - miszerint az aprotinin csökkenti az uPA kifejeződését mRNS szinten - nagyobb rálátást enged az aprotinin uPA-plazminogén-plazmin rendszer működésére, és ezzel hozzájárulnak a sebgyógyulási folyamatok jobb megértéséhez.

4.1.3 Plazminogén aktivátor inhibitorok a humán könnyben, jelentőségük a haza kialakulásában

Refraktív lézersebészeti beavatkozásokat (PRK, LASIK) követően vizsgált humán könnyminták PAI-1 és PAI-2 szintjeinek vizsgálatai során megállapítottuk, hogy a PAI tartalma PAI-2 típusú, a PAI-1 (61 minta, PRK kezelés) mért értékei minden esetben a detektálhatósági határ (4 ng/ml) alatt maradtak. Vizsgálataink során, a könnyminták PAI-2 értékeiben nem találtunk szignifikáns különbséget a két műtégi típus vonatkozásában. Az egyénre vonatkoztatott különbségek vizsgálata során azonban, a műtétet közvetlenül megelőzően és azt követően mért PAI-2 értékek szignifikánsan eltértek ($p < 0,001$) mindkét típusú beavatkozás esetében. Statisztikailag szignifikáns különbséget nem sikerült kimutatnunk azonban

semmilyen egyéb kombinációs vizsgálat során az 1., 3., és 5. posztoperatív napok összehasonlítása vonatkozásában ($p > 0,10$).

A preoperatív refrakciós hiba PRK és LASIK kezelésen átesett betegeink esetében kétmintás t-próbával vizsgálva nem mutatott szignifikáns különbséget ($p = 0,152$). A posztoperatív követési időszakban (3 hó), PRK (46 szem) kezeléseket követően a corneális sebgyógyulási folyamat komplikációk nélkül zajlott 40 szemben (tisztá szaruhártya), egy esetben alakult ki haze (Hanna, 2 stádium). További öt esetben igen enyhe corneális opacifikációt detektáltunk. Ezen esetek közül, egy páciensünk esetében mértünk emelkedett PAI-2 szintet a kezelést megelőzően (2 SD értéket meghaladó) és egy esetben volt hasonlóan emelkedett a mért érték a műtétet követően közvetlenül. A 3. és 5. posztoperatív napokon ezen esetekben a mért PAI-2 szint a könnyben 1SD értéken belül maradt. A komplikáció nélkül zajló (tisztá cornea) sebgyógyulási folyamatok esetében, a PRK kezelés előtt és után közvetlenül mért PAI-2 szintek 2SD értéken belül maradtak. A harmadik posztoperatív napon három, az ötödiken egy szem vonatkozásában mértünk 2 SD értéket meghaladó könny PAI-2 szintet. Hasonló eloszlást (2SD érték alatti) 146 mérés vonatkozásában figyeltük meg, ezért messzemenő következtetést nem lehet levonni a könnyben individuálisan magasabbnak mért PAI-2 szint és a későbbiekben esetlegesen kialakuló corneális subepiteliális homály között.

LASIK típusú beavatkozást követően vizsgálataink során haze nem alakult ki. A könnyben egy esetben mértük 2 SD értéket meghaladó PAI-2 szintet preoperatíven, valamint az első posztoperatív napon, statisztikai relevancia nélkül.

Fenti eredményeink a PAI-1 hiányát - detektálhatósági szint 4 ng/ml alatti értékét - bizonyítják a humán könnyben, valamint fotorefraktív lézerkezelést (PRK, LASIK) követően. A PAI-2-t azonban sikerült kimutatnunk a humán könnyben. A könny PAI-2 értékei és mintázata PRK és LASIK típusú beavatkozások esetében is hasonló. A műtétet közvetlenül követően a könny PAI-2 szintje jelentős mértékben megemelkedik, majd hamarosan visszasüllyed a kiindulási (preoperatív) értékre. A két műtéti típus technikailag eltérő ugyan, - minek eredményeként a sebgyógyulási folyamat pathomechanizmusa is különbözhet – azonban hasonló folyamatokat véltünk felfedezni enzimikus kontrolljaikban. Továbbá, az általunk detektált PAI-2 mintázat, korábbi kutatásaink uPA mintázatának komplementerének is bizonyult. Normál sebgyógyulás esetén a detektálható PAI-2 szint alacsony, miközben a mért uPA aktivitás magas a humán könnyben és vice versa.

Korábbi tanulmányaink összefüggést igazoltak a 3. posztoperatív napon mért alacsony uPA aktivitás és a késői posztoperatív haze között. Kutatási ismereteink szerint a haze kialakulását okozhatja az uPA csökkent expressziója és a PAI-2 emelkedett koncentrációja is.

4.1.4 A plazminogén aktivátor és inhibitor, valamint hormonális szintek változásai várandósság során

Várandósság során a hemosztázis minden folyamatában fontos változások zajlanak. Normál várandósság alatt a koagulációs aktivitás egyensúlyban van az uPA, tPA, PAI-1 és PAI-2 vér szintjeiben bekövetkező jelentős változások ellenére. Ezen változások szükségesek ahhoz, hogy a várandósság előrehaladtával a méh és köldök artéria hemodinamikája felkészüljön a magzat befogadására és szülés közben is biztosított legyen az anyai védelem.

A várandós nők *könnymintáiban mért PAI-2* szintek átlagértékei között szignifikáns különbséget a különböző várandóssági időszakok mérési periódusaiban nem tudtunk kimutatni. Továbbá, nem volt szignifikáns különbség kimutatható előző tanulmányunk mérési eredményei (26,7 ng/ml) és kontroll pácienseink PAI-2 átlagértékei (20,5 ng/ml) között sem.

Statisztikailag szignifikáns különbséget várandós pácienseink *vérmentáiban* a 8-13. hét, és a szülést követő első hét mért PAI-2 átlag értékei között sem találtunk. Meredek emelkedés volt azonban megfigyelhető az átlagértékekben a 16. hét, a 23-26. és a 34-36. heteken, mely értékek statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak egymáshoz képest és a 8-13., valamint a 41. héten mért átlagértékekhez képest is.

Variancia analízist végeztünk a PAI-2 mérések összehasonlítása érdekében. A vér PAI-2 szintjét vizsgálva a páciensek mérési eltéréseiben az öt várandóssági időszakban statisztikailag szignifikáns különbség nem volt kimutatható ($p=0,41$), azonban szignifikáns ($p<0,001$) volt a különbség a különböző várandóssági időszakokban végzett mérések között. A várandóssági időszakok mérési eltéréseit figyelembe véve és az öt várandóssági periódusban mért mérési különbségeket vizsgálva a könny PAI-2 szintjében nem volt szignifikáns különbség ($p=0,30$).

A vérben mért PAI-2 szint a várandóssági kor előrehaladtával szignifikánsan magasabb volt a könnyben mért átlag PAI-2 szinthez viszonyítva. A könnyben mért PAI-2 szintek nem mutattak korrelációt a vér PAI-2 értékeivel. A könnyben mért PAI-1 szintek, alkalmazott módszerünk detektálhatósági határa alatt maradtak. A vérben mért PAI-1 átlagértékei a 11. héten $85,8 \pm 29$ ng/ml; a 16. héten $90,5 \pm 32,2$ ng/ml; és a 24. várandóssági héten $125,9 \pm 26,1$ ng/ml voltak. Állapotos női pácienseink vérmintáinak az ösztadiol- és progeszteron szint átlagértékei a várandóssági kor előrehaladtával meredeken emelkedtek, mely korrelált a vérben mért PAI-2 értékekkel, azonban a könnyben ez nem volt kimutatható.

Várandós nők könnyében, a PAI-2 szint sebzés vagy műtét hiányában nem emelkedik a terhességi kor előrehaladtával. Ugyanakkor, ha a szemfelszín sérül (pl. trauma, kémiai sérülés,

műtét stb.) a helyi PAI-2 szintemelkedésért felelős mechanizmusok erőteljesebben juthatnak érvényre a terhesség folyamán.

Vizsgálni kívánt könnymintáink bimodális uPA eloszlása miatt eredményeinket két csoportra osztottuk: „nem nulla uPA” és „nulla uPA” értékek a vizsgált három gesztációs kategóriában. A „nem nulla uPA” értékek vonatkozásában a telességet megelőzően és az alatt, valamint szülést közvetlenül követően az értékek gyakorlatilag változatlanok maradtak. A „nulla uPA”-érték vonatkozásában azonban emelkedés volt kimutatható a terhességi kor előrehaladtával, mely mind a terhességet megelőzően, mind azt követően nulla uPA értékre tért vissza. Ezen megfigyelések feltételezhetően arra utalnak, hogy az uPA vonatkozásában a könny lokális forrással is rendelkezik. Hasonló következtetésekre jutottunk, amikor a könnyből származó PAI-2 mintázatokat vizsgáltuk, és a könnyminták PAI-2-szintjeit függetlennek találtuk a terhességi kortól, míg a vérmintákból származó PAI-2 szoros korrelációt mutatott a gesztációs korrall idejétől.

A várandósság kockázati tényező a haze kialakulásában PRK kezelést követően. Várandósság alatt szemészeti műtét végzése nem ajánlott. A refraktív sebészeti beavatkozások esetében minimum három hónapot javasolt várni szülés és/vagy szoptatás után, mert a hormonális változások hatást gyakorolhatnak a refrakciós hibákra és a szaruhártya sebgyógyulási folyamatára is. Esetenként azonban a várandós nők szaruhártya műtéten eshetnek át trauma miatt, vagy a várandósság igen korai, még nem azonosított szakaszában. A várandósság során bekövetkező enzimikus változásokról szerzett ismeretanyag segítheti a corneális sebgyógyulási folyamatok pathomechanizmusának pontosabb megismerését is. A sebgyógyulási folyamatokat szabályozó komplex rendszer további kutatására van szükség ahhoz, hogy a várandósság során esetlegesen szükségessé váló szemészeti műtéteket nagyobb biztonsággal végezhesünk.

4.1.5 A rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása a szaruhártya fekélyek gyógyításában, állatmodellben

Jelenlegi ismereteink szerint a PAI-1 és PAI-2 számos gyógyászati alkalmazása ismert, ugyanakkor nincs tudomásunk uPA ellenes gátlószert gyógyítási eljárásban történő használatáról. A PAI-2 hatásosságát - mint uPA inhibitor - vegyi sérülések gyógyításában állatmodellben kívántuk bizonyítani. Jelenlegi ismereteink szerint elsőként állítottunk elő szemcsepp formában alkalmazható rekombináns PAI-2 fehérjét.

Állatmodellben bizonyítottuk, hogy a rekombináns PAI-2 fehérje hatásos a vegyi sérülések kezelésében, hatásosabb, mint az aprotinin szemcsepp alkalmazása. A NaOH okozta

sérülést követően kialakuló haze vonatkozásban nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll (Ciloxan szemcsepp) és kezelt (Ciloxan, EDTA, cisztein és aprotinin kombinált szemcsepp) állatok között egyik posztoperatív kontroll napon sem. Mindkét kezelési séma vonatkozásában az első nap stádiumához képest viszonyított haze képződés szignifikánsan csökkent a követés minden egyes kontroll napján. A Ciloxan és rekombináns PAI-2 fehérjével lokálisan kezelt szemek esetében azonban a haze súlyossága a kontroll (Ciloxan szemcsepp) csoportban jelentősebb volt. A haze súlyossága szignifikánsan különbözött a kezelést követően az első ($p=0,042$) és a 11. posztoperatív napokon ($p=0,042$). A kialakult haze mértéke szignifikánsan csökkent az első posztoperatív naphoz viszonyítva a sérülést követő napokban mind a kontroll, mind a kezelt szemek vonatkozásában.

A két kezelt csoport vonatkozásában a haze stádiumait alapul véve, minden egyes kontroll napon tisztább szaruhártyákat találtunk a Ciloxan és PAI-2 lokális szemcsepp kezelés esetén, szemben a Ciloxan/EDTA/cisztein/aprotinin szemcsepp kombinált alkalmazásával. A kezelést követően kialakuló haze stádiumai között szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni a sérülést követő bizonyos napokon. Az alkalmazott PAI-2 kezelés csökkenti a kémiai sérülés után kialakuló haze súlyosságát és lehetőséget biztosít a gyorsabb gyógyulásra. Dózis-hatásgörbe felvételével figyelembe vehetjük, hogy a normál humán könnyben mért uPA aktivitás lényegesen alacsonyabb, mint a nyúlkönny uPA aktivitása, s patológiás könnyminták esetében is csak mintegy 0,5-1 IU/ml értéket ér el. Ezért az alacsonyabb PAI-2 tartalmú (0,1-1 IU/ml uPA ekvivalens) szemcsepp alkalmazása is terápiás hatékonyságú lehet.

A munkacsoportunk által sikeresen termelt és tisztított rekombináns PAI-2 fúziós fehérje további vizsgálatok után lehetőséget biztosíthat a szaruhártyafekélyek gyógyításának klinikai alkalmazásában is.

4.2 Diabéteszes retinopátia szűrésére vonatkozóan elért eredményeink

4.2.1 Könny fehérjekoncentráció analízis II-es típusú cukorbetegség könnymintáiban

A II-es típusú DM-ban szenvedő pácienseink könnymintáit vizsgálva a minták összfehérjekoncentrációja alacsonyabbnak bizonyult a DR előrehaladásával. A könny fehérjekoncentrációja nagy egyéni eltéréseket mutatott, de a DR súlyossága szerinti csoportbontás tekintetében szignifikáns különbség volt kimutatható ($p<0,05$) a normál és proliferatív, valamint a normál és a nem-proliferatív csoportok vonatkozásában. A tömegspektrometriás analízis során - minimum 95%-os megbízhatósággal - 53 fehérjét tudtunk azonosítani, melyből 47-et sikerült kvantifikálni. Proliferatív DR esetén néhány fehérje relatív mennyisége szignifikánsan magasabbnak bizonyult a nem-proliferatív stádiumhoz képest. A

cukorbeteg minták több mint 10 %-ánál 15 "jellemző" fehérje jelent meg az azonosított 53 fehérje közül, melyek relatív mennyiségében emelkedés volt megfigyelhető a betegség előrehaladtával.

A lizozim C, mammaglobin B és lipofilin A relatív szintjei szignifikánsan növekedtek a proliferatív csoportban a nem proliferatív, valamint a normál csoportokhoz viszonyítva. A PRP4 fehérje esetében szignifikáns növekedés csak a normál és proliferatív DR-ás csoportok között volt kimutatható, míg a lipofilin A esetében a különbség minden csoportban szignifikánsnak bizonyult. A cisztatin S szint szignifikánsan megemelkedett a nem proliferatív DR-ás csoportban a normál csoporthoz képest, valamint szignifikáns csökkenés volt kimutatható a nem proliferatív- és proliferatív DR-ás csoportok között. Figyelembe véve, hogy a teljes fehérje tartalom proliferatív DR esetén szignifikánsan alacsonyabb, továbbá a laktotranszferrin és lizozim C szintek a kor előrehaladtával is csökkennek, a 15 azonosított fehérjekoncentrációjának növekedése esetlegesen előrejelezheti a DR súlyosbodását, így potenciális biomarkernek tekinthetők.

A mélyebbre ható adatelemzés érdekében GeneSpring 7.3 szoftvert (Agilent Biotechnologies) alkalmaztunk. A lakritin esetében kétszeres csökkenés volt megfigyelhető, abban az esetben, ha a nem proliferatív DR-ás csoportot hasonlítottuk össze a normál csoporttal és két és félszeres növekedés abban az esetben, amikor a proliferatív csoportot hasonlítottuk össze a nem proliferatív DR-ás csoporttal. Hasonló eredményeket figyelhettünk meg a normál és proliferatív DR-ás csoportok összehasonlító elemzése esetén is. Az Ig λ lánc C régiója több mint háromszoros növekedést mutatott, amikor a normál és nem proliferatív, valamint a nem proliferatív- és proliferatív DR-ás csoportok összehasonlítását végeztük. Szignifikáns volt a különbség a laktotranszferrin és lipokalin-1 esetében a normál és proliferatív DR-ás csoportok között, mely mindkét fehérje esetében több mint kétszeres növekedést mutatott. A GeneSpring analízis mellett, a manuális elemzés alapján a lipofilin A és lizozim C esetében is kimutatható volt a több mint kétszeres változás a proliferatív és normál csoportok összehasonlításakor, valamint az Ig λ lánc C régiója esetében a proliferatív és nem proliferatív csoportok összehasonlításakor is.

A potenciális DR biomarkerek megfelelő specificitása érdekében, a releváns szakirodalom áttekintésével szűrtük ki azokat, melyek egyéb klinikai kórképekkel is összefüggésbe hozhatóak. Könnyproteomikai vizsgálataink és irodalmi elemzéseink alapján a könny lipokalin-1, laktotranszferrin, lakritin, lizozim C, lipofilin A és Ig λ -lánc C régiójának szintjének változásai nincsenek kapcsolatban a szakirodalomban felsorolt és áttekintett

gyakoribb kórképekkel, míg DR-ban specifikusan vannak jelen, mely alkalmassá teheti őket biomarkerként való alkalmazásra.

A ProteinPilot 2.0.1. által generált adatok a fehérjék relatív mennyiségét adják meg az egészséges kontrollokban található fehérje mennyiségéhez viszonyítva, azonban nem szolgáltatnak információt a fehérjék potenciális biomarkerként történő alkalmazhatóságára vonatkozóan. A lehetséges biomarkerek meghatározása érdekében ROC analízist végeztünk.

A ROC analízis 0,6-nál magasabb AUC értéket (Area under the curve, görbe alatti terület) mutat az Ig λ -lánc C régiója és lipokalin-1 esetében a normál és nem proliferatív DR-ás csoportok összehasonlításakor, valamint a lakritin, laktotranszferrin és lipokalin-1 esetében a nem proliferatív- és proliferatív DR-ás csoportok összehasonlítása esetén.

A legmagasabb AUC értékeket a lipokalin-1 (AUC: 0,71) és a laktotranszferrin (AUC: 0,71) esetében kaptuk. A ROC analízis azt mutatta, hogy a normál és a proliferatív DR-ás csoportok közötti különbség jobban kimutatható, mint bármely más csoport közti különbség, illetve a csoportok elkülöníthetősége erőteljesebb, amennyiben több biomarkert vizsgálunk.

A DR proliferatív szakaszának az előrejelzése kritikus a vízus megmentése szempontjából. A proliferatív DR kialakulása II-es típusú DM esetén, a páciens kardiovaszkuláris betegségei szempontjából is prognosztikus értékű, ezért fontos ezen páciensek nagy kockázatú csoportba történő átsorolása.

4.2.2 Gépi tanuló rendszerek a diabéteszes retinopátia szűrésében

A cukorbetegség számának jelentős emelkedése, valamint a betegek igénye szűrőprogramokban történő részvételre, jelentős munkaterhet ró a szűrőrendszerek alkalmazottaira. Munkánk során olyan eljárásokon dolgoztunk, melyek alkalmasak lehetnek a diabéteszes páciensek automatizált előszűrésére. A negatív - DR jeleit nem mutató - képek kiválogatásával kb. 60-70%-ban csökkenthető volna azon képek száma, melyeket a szűrőcentrumokban dolgozó képelemzőknek kell vizsgálniuk.

A DR automatikus szűrését célzó informatikai képfeldolgozó eljárások, széles publikációs múltra tekintenek vissza. Teljesítményük ígéretes, azonban a klinikai gyakorlatban a humán képolvasókhoz viszonyított alig gyengébb szenzitivitási és specificitási mutatói miatt lassan terjednek. Ezen lassú terjedését tovább nehezíti részben tisztázatlan jogi környezete.

Az előszűrés feladatának megvalósítására három eltérő megközelítést alkalmaztunk a tanuló algoritmusok bemenetként felhasznált adatfészeségei szerint: i) proteomikai adatokat, ii) digitális képfeldolgozás során kapott adatokat alkalmazó modellek és iii) a két adatfészeséget kombináló rendszerek alkalmazása.

4.2.2.1 A Könnyproteomikai alapú tanuló algoritmusok eredményei

Az azonosított hat marker könnyfehérjét (lipokalin 1, laktotranszferrin, lakritin, lizozim C, lipofilinA, Igλ-lánc) használva bemeneti adatként, a felépített modellek alapján az Rpart osztályozón alapuló eljárás teljesítménye felülmúlta a másik öt alkalmazott modell teljesítményét. Az Rpart osztályozóval szemben azonban a NaivBayes osztályozó szenzitivitási értéke magasabbnak adódott, specificitás értéke viszont igen alacsony (0,38) volt. Proteomikai adatokra épülő modellünk teljesítmény értékei szenzitivitás tekintetében 0,87; specificitása vonatkozásában 0,68.

A könnymintavétel nem invazív, gyors vizsgálati módszer, mely „bed-side kit” kifejlesztésével akár olcsó, rutinszerű diagnosztikai módszerré is válhat a közeljövőben. Könnyproteomikai vizsgálatokra alapozott modellünk ugyan önállóan nem alkalmas még a klinikai gyakorlatba történő bevezetésre, azonban számos lehetőség kínálkozik a módszer szenzitivitásának és specificitásának fokozására.

4.2.2.2 Képfeldolgozás alapú módszerek

A retinát érintő léziók nagy száma és variábilis megjelenése miatt az automata rendszerek fejlesztése során kifejlesztett algoritmusok olyan elváltozások detektálására fókuszálnak, amelyek könnyen leírhatóak, konzekvens megjelenésűek és érzékeny, korai indikátorai a DR kialakulásának, mint például a MA, mely a DR legkorábbi tüneteinek egyike és jelenléte nélkül nem állítható fel a DR diagnózisa.

A képfeldolgozás alapú döntéstámogató rendszerünk a megbízhatóbb eredményesség és jobb reprodukálhatóság érdekében egyféle elváltozás felismerésére fókuszált. Az eljárás alkalmazásával azonosított MA-k száma alapján soroltuk be a vizsgált retina képeket DR, vagy nincs-DR csoportba. A DR csoportba sorolt képeket a szűrőrendszer automatikusan szakember általi vizsgálatra irányította. Informatikai rendszer alapú MA modellünk teljesítmény mutatói a szenzitivitás 0,84; és a specificitás vonatkozásában 0,81.

A DR szűrésének a tekintetében, számos működő képfeldolgozás alapú módszer ismert, melyek teljesítménye összemérhető a humán vizsgálóéval. A független betegcsoporton, nemzetközi standardok szerint validált rendszerek száma azonban elenyésző. Abramoff és mtsai által kidolgozott módszertan többféle képfeldolgozás alapú módszertant kombinál, MA detektor mellett a bevérzések, a gyapottépésszerű gócok, és a kemény exsudátumok jelenlétét detektálja. Szenzitivitása 96,8%-os (95% megbízhatósági tartomány: 94,4-99,3) 59,4%-os

(95% megbízhatósági tartomány: 55,7-63) specificitás mellett. A rendszer használhatóságát bizonyos szempontból behatárolja alacsony specificitás értéke.

Gotman és mtsai a képadatbázis biztosan negatív képeinek kiszűrését tűzték ki célul, annak érdekében, hogy csökkentsék a vizsgálandó képadatbázis méretét. A kombinált képfeldolgozás alapú módszert a MA detektálása mellett a foltszerű vérzések és exszudátumok azonosítására is kidolgozták. Céljuk a 100%-os szenzitivitás elérése volt, mely alacsony specificitás értékkel párosult. A módszertan előszűrő eljárásaként alkalmazva a képadatbázisból a biztosan negatív képek 26,4%-át (MA/foltszerű vérzések/exszudátumok), illetve 38,1%-át (MA, makula centrált kép vizsgálata) volt képes eltávolítani.

4.2.2.3 Kombinált szűrés

A kombinált módszer kidolgozásának az ötlete azon elméleti megközelítésből származik, hogy az eltérő típusú adatforrásokból származó adatok kombinált alkalmazásával az általunk kidolgozott DR szűrő eljárás tovább javítható, teljesítménye fokozható.

A munkacsoportunk által létrehozott modellek alkalmasak arra, hogy a proteomikai adatokkal párhuzamosan egyéb adatféléseket is bemeneti információként alkalmazzanak a szűrővizsgálatok során. Ilyen bemeneti adatok lehetnek többek között az anamnesztikus klinikai információk, vagy a vizsgáló által készített képanyagok. Az alkalmazott adatfélések számának emelése megfelelő kombinációk esetén az eljárás teljesítményét szignifikánsan fokozhatja. Kombinált diagnosztikai módszertanokat már alkalmaznak a szűrő eljárások teljesítményének javítására.

A fentiekben ismertetett, könnyuproteomikai, illetve MA detektorokra épülő rendszerek bemeneteit kombináltan felhasználni képes új modellt építettünk fel. A két eljárás ötvözeteként megalkotott kombinált eljárásunk, mindkét korábban bemutatott modellünk teljesítményét meghaladta feltételezhetően a két eltérő adatfélés egymástól független, egymást kiegészítő információinak köszönhetően, szenzitivitása 0,93; specificitása 0,78.

Eredményeink alapján látható, hogy amennyiben modellünket egy adatfélésre építettük, teljesítménye a proteomikai alapú módszertan esetében elmaradt a MA-detektorhoz képest. Pontosság tekintetében mindkét egyéni modell teljesítményét felülmúlta a kombinált módszertan. A MA-detektor specificitási mutatói jobbak voltak még a kombinált modellhez képest is.

A munkacsoportunk által kidolgozott modellek alkalmasak arra, hogy a proteomikai adatokkal párhuzamosan egyéb adatféléseket is bemeneti adatként alkalmazzanak a szűrővizsgálatok során. Ilyen adatok lehetnek pl. klinikai információk vagy akár a vizsgáló által

készített képanyagok. A felhasznált adatfészeségek számának emelése - megfelelő kombinációk esetén - az eljárás teljesítményét jelentősen fokozhatja. A képfeldolgozás és a könny fehérje alapú markerek szűrésben történő alkalmazása két alapjaiban teljesen eltérő adatforrást reprezentálnak, így a DR-ás szemre nézve eltérő típusú információt hordoznak, ezáltal egymás hibáinak kiküszöbölésére képesek lehetnek.

A DR-szűrés által (jelenleg) elérendő célértékek, a humán vizsgálók által elért 0,8-as szenzitivitási és 0,95-ös specificitási értékek. Az általunk kombinált alapú szűréssel - vizsgálati beállítások mellett - elért eredmények 0,93-as szenzitivitás és 0,78-as specificitás, melyek megközelítik a humán vizsgálók teljesítményeit.

Eredményeink ismeretében javasolt a proteomikai kísérletben vizsgált fehérjék számának csökkentése. Amennyiben, a vizsgálni kívánt fehérjék száma csökken az MS/MS módszertan egyszerűbb fehérje kimutatási módszerre (assay) felcserélhető. Alkalmazott szűrőmódszerünk előnyei, a könnymintavétel könnyű kivitelezhetősége és növelhető áteresztőképessége.

A szűrővizsgálati rendszerek kifejlesztésekor érdemes a hangsúlyt a szenzitivitás fokozására fektetni - akár a specificitás értékeinek rovására is -, hiszen célunk nem a humán vizsgáló kiváltása, hanem munkaterheinek a csökkentése.

4.2.3 Potenciálisan alkalmazható új vizsgáló eljárások a DR szűrésében

4.2.3.1 *In vivo* konfokális cornea mikroszkópia

Az emberi szaruhártya érző idegrostokban gazdag szövet. Beidegzése fontos szerepet játszik a szemfelszín funkcionális és morfológiai integritásának megtartásában, továbbá védő és trófikus funkciókat (is) szolgáltat. Előzetes ismereteinkre alapozva mely szerint részben ismert az abnormális corneális idegrost morfológiai felnőtt DM-ban szenvedő betegek esetében, minimális neuropátia jelenlétében, illetve annak hiányában is, CCM vizsgálatokat végeztük fiatal, I-es típusú cukorbetegeken.

Diabéteszes pácienseink átlagéletkorában statisztikailag szignifikáns eltérés nem volt kimutatható; az I-es típusú diabéteszes betegek (T1DM) és a kontroll csoportok összehasonlításakor ($p=0,08$). Az T1DM betegek csoportjában a betegek megoszlása a DR vonatkozásában az alábbiak szerint alakult: 15 páciensnél nincs DR utaló jel, DR- 2-es stádium 2 páciens, DR- 3-as stádium 1 esetben, és DR- 4-es stádium 7 páciensünk esetében volt diagnosztizálható. A retinopátiás betegek csoportjában, 9 esetben történt pánretinális lézer fotokoaguláció.

A corneális sejtek vizsgálata során, statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb volt a T1DM páciensek bazális epitél ($p < 0,001$) és endotél ($p = 0,001$) sejtszámai a kontroll csoporthoz viszonyítva. A poszterior strómában a keratocita sejt sűrűséget szignifikánsan magasabbnak találtuk ($p = 0,001$) a T1DM betegek esetén a kontroll csoporttal összehasonlítva. A bazális epitélium ($p < 0,0001$) és az endotél ($p = 0,02$) sejtsűrűség szignifikánsan alacsonyabbnak, míg a keratocita sejt sűrűség ($p = 0,02$) magasabbnak bizonyult a retinopátia nélküli T1DM betegeknél a kontroll személyekkel összehasonlítva. Az epitél ($p = 0,04$) és az endotél ($p = 0,004$) sejtsűrűség a retinopátiás T1DM esetén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a nem retinopátiás T1DM páciensekkel összehasonlítva.

A cornea idegrost réteg változásainak a vizsgálata során statisztikailag szignifikáns eltérést találtunk az idegrostok sűrűsége (nerve fibre density, NFD; ($p = 0,004$)), az idegelágazódások sűrűsége (nerve branch density, NBD; ($p = 0,004$)), az idegrostréteg hossza (nerve fibre length, NFL; ($p = 0,001$)) és az idegrost teljes elágazódásainak sűrűsége (nerve fibre total branch density, TBD; ($p = 0,04$)) értékek a T1DM betegek összehasonlítva a kontroll személyekével. Az idegrost terület (nerve fibre area, NFA) értékeit tekintve nem találtunk szignifikáns eltérést a 3 csoport összehasonlításának a vonatkozásában ($p = 0,144$). Szignifikánsan magasabbnak találtuk az idegrost szélességet (nerve fibre width, NFW; ($p = 0,04$)) azonban a T1DM esetén a kontrollal összevetve. Post-hoc analízissel az NFD értékeiben nem találtunk eltérést ($p = 0,256$), de alacsonyabb NBD ($p = 0,02$) és NFL ($p = 0,04$) értékeket találtunk a nem retinopátiás T1DM esetén a kontrollokkal összehasonlítva. Az NFD ($p = 0,003$), az NBD ($p = 0,001$), az NFW ($p = 0,03$) és a TBD ($p = 0,05$) értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak retinopátiás T1DM betegek esetén a kontrollokhoz képest. Az NFD ($p = 0,03$) értékekben is szignifikáns eltérést találtunk a retinopátiás és a nem retinopátiás T1DM pácienseket összehasonlítva.

A retinopátiás T1DM pácienseknél szignifikáns fordított korrelációt véltünk felfedezni az NFD ($r = -0,428$; $p = 0,029$) és az NFL ($r = -0,387$; $p = 0,046$) értékekben. A T1DM betegek szérum koleszterin szintje fordított korrelációban áll az NFL ($r = -0,511$; $p = 0,025$) és az NFW ($r = -0,450$; $p = 0,047$) értékekkel. A cukorbetegség fennállása, a HbA_{1c}, a szérum triglicerid, a HDL koleszterin és az eGFR értékeket összevetve a morfológiai elváltozásokkal azonban nem tudtunk szignifikáns korrelációt kimutatni ($p > 0,05$). 2 éves követéses vizsgálatunk nem mutatott jelentős változást az epitél, keratocita és endotél sejtszámban, valamint a centrális szaruhártya vastagságban sem a diabéteszes és kontrollcsoportok között. Szintén nem állapítottunk meg szingifikáns eltérést a corneális idegrost morfológiai paraméterekben a DR-ban nem szenvedő T1DM betegek és az egészséges személyek között. A NFL szignifikánsan alacsonyabb értéket

mutatott DR-ban szenvedő betegeknél, mint az egészségeseknél ($p=0,002$). A 2 éves követés alatt a NBD ($p=0,03$) és NTBD ($p=0,04$) szignifikánsan csökkent a NFA ($p=0,08$) és NFW ($p=0,07$) paraméterekkel együtt a DR-ban nem szenvedő betegeknél. A NFD ($p=0,04$) szintén szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a DR-ban szenvedő betegek csoportjában. A szérumban trigliceridek fordítottan korreláltak a NFW értékével ($r=-0,339$, $p=0,04$), de nem volt szignifikáns összefüggés a diabétesz fennállása, a HbA1c, a HDL, és eGFR, valamint bármely corneális idegi paraméter között a T1DM csoportokban.

Széles körű corneális mikroszerkezeti változást mutattunk ki I-es típusú diabéteszes betegeken, mely DR esetén szignifikánsan megváltozott. DM esetén, mind gyermek mind felnőtt vizsgálati csoportokban a bazális epitélium, valamint az endotél sejtek száma lecsökkent. Tanulmányunkban a poszterior strómában lévő keratocita sejtsűrűséget magasabb számban detektáltuk I-es típusú diabéteszes betegeknél az egészséges kontrollokhoz képest. Ezzel ellentétben, más vizsgálok nem találtak szignifikáns különbséget a keratocita sejttségben a kontroll, és a II-es típusú diabéteszes beteg csoportokat összehasonlítva. A keratociták felelősek a strómális extracelluláris mátrix fenntartásáért, és kulcsszerepet játszanak a szaruhártya sebgyógyulásában. Az inzulin felgyorsíthatja a corneális stróma fenntartását sebést követően. Korábban már találtak némi különbséget a normál és a diabéteszes keratociták génexpressziójában a jelátviteli útvonalakkal kapcsolatban. Ezek a megváltozott jelátviteli utak talán nagyobb jelentőséggel is bírnak, mint a keratociták sejttségé. Tanulmányunkban kimutattuk a corneális idegrostrétegek rendellenességeit (is): alacsonyabb számú idegelágazódást és hosszúságot találtunk a fiatal diabéteszes retinopátiás betegeken, illetve mikroalbuminuriát, megerősítve ezzel a korábban leírt eredményeket az I-es és a II-es diabéteszes betegeknél. Továbbá, az automata analízis segítségével a diabéteszes betegeknél kevesebb főidegrost elágazódási pontot tudtunk detektálni, megerősítve ezzel a korai idegelágazódási pontok elvesztését, a nagyobb idegrost szélességgel és a távolabbi ágak elvékonyodásával összhangban. Érdekes módon a teljes idegrostterület hasonló képet mutatott a kontroll és a diabéteszes betegek esetében, feltehetően a főbb idegrostok korai relatív megkíméltsége, és az elágazódások számának csökkenése következtében.

Tanulmányunk eredményei összhangban voltak a korábbi publikált ismeretekkel, miszerint a corneális idegrostok elváltozásai összefügghetnek a retinopátia súlyosságával, illetve a retinopátia jelenlétével. Vizsgálataink eredményei alapján a CCM alkalmas lehet az I-es típusú diabéteszes betegek szubklinikai állapotának a vizsgálatára, a betegség korai stádiumában történő szűrési céllal történő alkalmazásra.

4.2.3.2 Az ultraszéles pásztázó lézer oftalmoszkópia

Az ultraszéles látószögű lézer scanning oftalmoszkóp (P200C AF) szűrés céljára történő alkalmazhatósági vizsgálatának az érdekében kétlépcsős analízist végeztünk. Első lépésként a makula patológiás elváltozásait osztályoztuk; 121 szem hagyományos digitális és a P200C AF ultraszéles látószögű lézer scanning oftalmoszkóp által készített képeinek vonatkozásában, ugyanazon beteganyagon. A hagyományos digitális technikával készült képek közül, kilenc kép nem volt alkalmas minőségileg az analízisre, még a széles látószögű képek vonatkozásában ilyen probléma nem merült fel.

A két képalkotó eljárás összehasonlítására a maradék 112 szem fundusfotó dokumentációit használtuk. Végállapotú AMD esetében (19 szem) a két eljárás összehasonlításakor 96,43%-os egyezést ($k=0,93$) találtunk, melyet egyetlen kép eredményezett. Drusen kategóriában; a hagyományos digitális képek alapján 77 szemet, még a P200C AF képek osztályozása alapján 74 szemet soroltunk. A két képalkotó eljárás közti különbségért ebben a csoportban három szem volt a felelős, melyeket a P200C AF képalkotó alapján normálként osztályoztunk, 96,11% egyezéssel ($k=0,00$). Normál fundusképek összehasonlításakor eltérést nem találtunk a két modalitás elemzése között.

Második lépésként két független képolvasó végzett részletes képelemzést az alábbi elváltozások vonatkozásaiban (5-5 fundusfotó): kemény drusen, GA, CNV, valamint puha drusen (6 fundusfotó). Klinikailag releváns eltérés nem volt kimutatható a két képolvasó vizsgálati eredményei között, így az általuk végzett részletes osztályozásokat egységesként kezeltük és a két képalkotó eljárást hasonlítottuk össze. A képolvasók megbízhatósága mindkét képalkotó eljárás vonatkozásában erőteljes szignifikanciát mutatott, kivéve a kemény drusen ($< 63 \mu\text{m}$) és a közepes méretű lágy drusen ($63 - 125 \mu\text{m}$) eseteit. A képolvasó önmagához viszonyított megbízhatóságának a megállapításához az általa vizsgált és osztályozott képeket újraelemzte. A képolvasó önmagához viszonyított megbízhatósága minden vizsgált kategóriában magas volt, kivéve a drusenek egyes esetei. Ezt az eltérést következetesen egy fundusfotó eredményezte, melyet az első osztályozás alkalmával maga az elemző sem tartott megfelelő minőségűnek és nem elemezhető, rossz minőségű kép kategóriába osztályozta.

Tanulmányunk azonos fenotípusokra vonatkoztatva nagyon magas egyezést mutatott a vizsgált képi modalitások között. A P200C AF ultraszéles látószögű oftalmoszkóp által készített képek megbízhatóan alkalmazhatóak a szemfenéki elváltozások detektálására és az elváltozások meghatározására. A képolvasók egymáshoz viszonyított és a képolvasó önmagához viszonyított variabilitása alacsony volt (magas egyezés) mindkét képalkotó eljárás

esetén. A két képalkotó eljárás által készített, és a képelemzők által osztályozott fundusfotók egyezése magas volt, kiugró K értékekkel. Kivételt azon esetek képeztek, ahol túl kevés kategória állt rendelkezésre az összehasonlításhoz. A képelemzés kezdeti szakaszában, a kis kemény drusenek azonosítása okozott nehézséget (elsősorban), melyet feltételezhetően a drusen és a pixel méretek közötti hasonlóság eredményezett az ultraszéles látószögű oftalmoszkóp által készített képeken. Ezt tükrözi az alacsonyabb egyezés és K érték.

A makula vizsgálata során végzett, hagyományos (45°) és ultraszéles látószögű (200°) digitális képek osztályozása szignifikáns egyezést mutatott az általunk vizsgált elváltozások eseteiben. Ezen vizsgálat a jövőbeni alapját képezi az ultraszéles látószögű képek periférikus retinális elváltozásainak elemzéseinek, melyek korábban fel nem ismert rendellenességeket tárhatnak fel a retina periferiáján, továbbá hozzájárulhatnak a különböző kórképek (pl. AMD és DR) kialakulásának és patológiai rendellenességeinek megértéséhez.

5. ÚJ EREDMÉNYEK

5.1 A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak vonatkozásában

- Megállapítottuk, hogy a szaruhártya refraktív lézerkezelését követő sebgyógyulási folyamatok során a páciensek könnymintáinak urokináz uPA szintje jellegzetes mintázatot mutat a korai posztoperatív időszakban, és ez a mintázat szignifikánsan különbözik normál, illetve komplikált sebgyógyulás (haze) során, mely utóbbiról igazoltuk, hogy szerin proteináz inhibitor alkalmazásával indukálható.
- Igazoltuk az állatmodell és a humán könnyminták uPA mintázatának hasonlóságát – normál, illetve komplikált sebgyógyulás esetén - és bizonyítottuk, hogy a nyúl kiváló modell a corneális sebgyógyulási folyamatok tanulmányozására, miközben vemhessége a posztoperatív haze kialakulásának valószínűségét jelentős mértékben fokozza. A haze kialakulását egyaránt eredményezheti az uPA csökkent expressziója és/vagy a PAI-2 emelkedett koncentrációja, és szignifikánsan csökkenthető kialakulási valószínűsége az uPA lokális (szemcsepp) pótlásával.
- Rekombináns PAI-2 szemcseppet állítottunk elő, mely állatkísérletben vegyi sérülést követően alkalmazva csökkenti a haze súlyosságát.

5.2 A diabétesz okozta szemszövődmények szűrésének vonatkozásában

- Elsőként azonosítottuk a DR-ban szenvedő betegek könnyfilm-rétegében megjelenő specifikus fehérjéket és izoláltuk közülük azokat, amelyek a könnyből történő DR szűrésére potenciálisan alkalmazhatóak, valamint igazoltuk, hogy az automatizált szűrőprogramok kombinálása a könny-proteomikai elemzéssel javíthatja a szűrőprogramok találati pontosságát.
- Kombinált eljárásunk vizsgálati körülmények között elérte 0,93-as szenzitivitás és 0,78-as specificitás értékeit, mely közelíti a humán vizsgálók szűrési célértékeit (0,80-as szenzitivitás és 0,95-as specificitás).
- In vivo corneális konfokális mikroszkópiával 1-es típusú diabétesz mellituszban szenvedő fiatalok szaruhártyáinak vizsgálatkor morfológiai eltéréseket állapítottunk meg, amelyek összefüggést mutattak a retinopátia jelenlétével, illetve súlyosságával. Továbbá, elsőként dokumentáltuk fiatal diabéteszes betegek longitudinális vizsgálata során a korai és progresszív corneális idegrost morfológia károsodását.
- A makula vizsgálata során végzett, hagyományos (45°) és ultraszéles látószögű (200°) digitális képek osztályozása szignifikáns egyezést mutatott az általunk vizsgált elváltozások eseteiben. Ezen vizsgálat a jövőbeni alapját képezi az ultraszéles látószögű képek periférikus retinális elváltozásainak elemzéseinek, melyek korábban fel nem ismert rendellenességeket tárhatnak fel a retina perifériáján, továbbá hozzájárulhatnak a különböző kórképek (pl. AMD és DR) kialakulásának és patológiai rendellenességeinek megértéséhez.

6 AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

6.1 A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak vonatkozásában

Eredményeink közül a szaruhártya refraktív lézersebészeti beavatkozását követően a klinikai gyakorlatában közvetlenül is hasznosíthatónak az alábbiakat gondoljuk:

- A 3. posztoperatív napon mért alacsony uPA aktivitás a késői posztoperatív szakban kialakuló haze prediktív jele lehet.
- Az uPA lokális (szemcsepp) pótlása csökkentheti az esetenként kialakuló posztoperatív haze valószínűségét.
- Az általunk szabadalmaztatott eljárással előállított rekombináns PAI-2 fúziós fehérje további állatkísérletes és klinikai vizsgálatok után lehetőséget biztosíthat szaruhártyafekélyek gyógyításában történő felhasználására a klinikai gyakorlatban.

6.2 A diabéteszes szemszövődmények szűrése vonatkozásában

Eredményeink közül a diabétesz szűrésében, a klinikai gyakorlatban közvetlenül is hasznosíthatónak az alábbiakat gondoljuk:

- A könny proteomika alapú vizsgálatokat digitalizált retina képek automatizált feldolgozásával kombinálva a cukorbetegségben szenvedő, de DR eltérését nem mutató páciensek előszűrése. A kombinált eljárás bemeneti adatforrásai a digitális fundusfotón azonosított MA-k száma, valamint a könny fehérjék koncentráció értékei. A vizsgáló eljárás pontossága (0,93/0,78-as szenzitivitás/specifitás) erősen közelíti azt a minimum értéket, melyet a British Diabetic Association a szűrőprogramok számára meghatároz (0,80/0,95-ös szenzitivitás/specifitás).
- Az in vivo konfokális mikroszkópia alkalmas az I- es típusú diabéteszes betegek, szubklinikai állapotának a vizsgálatára, a betegség korai stádiumában történő szűrésére, valamint az új terápiás modalitásokból származó egészségnyereség monitorozására.
- A P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC, Dubfermline, UK) által készített fotódokumentációk a „gold standard” hagyományos kamera (45°) rendszerek által készített képeknek megfeleltethetőek és alkalmazhatóak rutin klinikai ellátásban.

7. MTMT tudományometriai adatok

Csutak Adrienne tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.07.02)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	45	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	35	414	485
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	6	1	1
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	1	1	1
összefoglaló közlemény	---	2	27	31
rövid közlemény	---	0	0	0
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	1	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	2	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	2	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	6	---	42	53
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	54	485	571
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	54	---	485	571
V. További tudományos művek	17	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	4	0	1
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Oltalmak, szabadalmak	---	13	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	1	---	1	1
Összes hivatkozás ¹	---	---	486	573
Hirsch index ⁶	16	---	---	---
g index ⁶	24	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	12	74
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	9	96
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	39	467
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	32	403
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	96	16,75%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	105
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

Készült: 2020. július 2. 11:41

9. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények, szabadalmak

Közlemények:

E. Deák, E. Szalai, N. Tóth, R.A. Malik, A. Berta, **A. Csutak**
Longitudinal Changes in Corneal Cell and Nerve Fiber Morphology in Young Patients With Type 1 Diabetes With and Without Diabetic Retinopathy: A 2-Year Follow-up Study
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1;60(2):830-837, 2019
DOI: 10.1167/iov.18-24516.
IF: 3.812 (2018)

A. Csutak, Z. Steiber, J. Tőzsér, A. Jakab, A. Berta, D.M. Silver
Plasminogen activator activity in tears of pregnant women.
PloS One. 12(5): e0177003, 2017.
DOI: 10.1371/journal.pone.0177003
IF: 2.766

E. Szalai, E. Deák, L. Módos, G. Németh, A. Berta, A. Nagy, E.N. Felszeghy, R. Káposzta, R. A. Malik, **A. Csutak**
Early Corneal Cellular and Nerve Fiber Pathology in Young Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Identified Using Corneal Confocal Microscopy.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57 (3), 853-858, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1167/iov.15-18735>
IF: 3.303

Z. Steiber, J. Tőzsér, D.M. Silver, A. Jakab, G. Németh, A. Berta, **A. Csutak**
Plasminogen activator inhibitor type 2 in human tears and blood during pregnancy.
Int. J. Ophthalmol. Eye Res. 3 (7), 121-125, 2015.
DOI: 10.19070/2332-290X-1500026

Z. Török, T. Pető, É. Csősz, E. Tukacs, Á. Molnár, A. Berta, J. Tőzsér, A. Hajdu, V. Nagy, B. Domokos, **A. Csutak**
Combined methods for diabetic retinopathy screening, using retina photographs and tear fluid proteomics biomarkers.
J. Diabetes Res, 501: Paper 623619. 8 p. 2015.
DOI: 10.1155/2014/623619
IF: 2.431

Z. Török, T. Pető, É. Csősz, E. Tukacs, Á. Molnár, Z. Maros-Szabó, A. Berta, J. Tőzsér,

A. Hajdu, V. Nagy, B. Domokos, **A. Csutak**

Tear fluid proteomics multimarkers for diabetic retinopathy screening.

BMC Ophthalmol.13 (1), 2013.

DOI:10.1186/1471-2415-13-40

IF: 1.075

É. Csősz, P. Boross, **A. Csutak**, A. Berta, F. Tóth, S. Póliska, Z. Török, J. Tőzsér

Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy.

Journal of Proteomics.75 (7), 2196-2204, 2012.

DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.019

IF: 4.088

A. Csutak, D.M. Silver, T. Sperka, J. Kádas, G. Vereb, A. Berta, J. Tőzsér

Urokinase down-regulation by aprotinin in rabbit corneal cells after photorefractive keratectomy.

Curr. Eye Res.35 (9), 806-811, 2010.

DOI: 10.3109/02713683.2010.490319

IF: 1.36

A. Csutak, D. M. Silver, J. Tőzsér, Z. Steiber, P. Bagossi, Z. Hassan, A. Berta

Plasminogen activator inhibitor in human tears after laser refractive surgery.

J. Cataract. Refract. Surg.34 (6), 897-901, 2008.

DOI: 10.1016/j.jcrs.2008.02.024

IF: 2.508

A. Csutak, D.M. Silver, J. Tőzsér, A. Berta

Wound Healing, Haze and Urokinase Plasminogen Activator After Laser Vision Correction Surgery.

Johns Hopkins APL Tech. Dig.27 (2), 198-207, 2007.

IF: 0.132

A. Csutak, D.M. Silver, J. Tőzsér, Z. Hassan, A. Berta

Urokinase-Type Plasminogen Activator to Prevent Haze after Photorefractive Keratectomy, and Pregnancy as a Risk Factor for Haze in Rabbits.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.45 (5), 1329-1333, 2004.

DOI: 10.1167/iovs.03-0881

IF: 3.577

Szabadalmak:

J. Tőzsér, G. Miklóssy, A. Berta, **A. Csutak**

Cím: Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és szemcseppként történő alkalmazása korneális szaruhártya fekélyek gyógyításában

Ügyszám: P0700769

Benyújtás éve: 2007.-Közzététel éve:2009

A szerzők kontribúciója azonos mértékű

J. Tózsér, A. Berta, **A. Csutak**, G. Miklóssy

Cím: Use of urokinase type plasminogen activator inhibitors for the treatment of corneal disorders

Elsőbbségi év: 2007. Benyújtás éve: 2008.

Közzététel éve: 2012. Közzététel száma: EP2224949B1

Lajstromszám: Ep 2224949

A szerzők kontribúciója azonos mértékű

Az értekezésben nem szereplő in extenso közlemények

Egyetemi doktori (PhD fokozat) megszerzése utáni in extenso közlemények

Sokszerzős vagy csoportos szerzőségű szakcikk

T2347 Study Group* (Kollaborációs szervezet) ; Aptel, Florent* ; Pfeiffer, Norbert ; Schmickler, Stefanie ; Clarke, Jonathan ; Lavín-Dapena, Cosme ; Moreno-Montañés, Javier ; Żarnowski, Tomasz ; **Csutak, Adrienne** ; Jugaste, Tiia et al. Non-inferiority of Preservative-free versus BAK-preserved Latanoprost-timolol Fixed Combination Eye Drops in Patients with Open-angle Glaucoma or Ocular Hypertension

J Glaucoma 28 : (6) pp. 498-506. , 9 p. 2019

DOI: 10.1097/IJG.0000000000001248

IF: 1.661

Összefoglaló cikk:

Csosz, E ; Kallo, G ; Markus, B ; Deak, E ; **Csutak, A** ; Tozser, J

Quantitative body fluid proteomics in medicine - A focus on minimal invasiveness.

J Proteomics pp. 30-43. , 14 p. 2017

DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.009

IF: 3.722

A Berta, E Tóth-Molnár, **A. Csutak**

Új nemzetközi konszenzusnyilatkozat a száraz szem definíciójáról, felosztásáról, etiológiájáról, diagnosztikájáról és terápiájáról

Orvosi Hetilap 159 : (20) pp. 775-785. , 11 p. 2018

IF: 0.564

Szakcikk:

É. Csősz, E. Deák, N. Tóth, C.E. Traverso, **A. Csutak***; J. Tőzsér*

*azonos kontribúció

Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications

Febs Open Bio 9 : (5) pp. 1020-1028. , 9 p. 2019

DOI: 10.1002/2211-5463.12637

IF: 1.959 (2018)

A. Csutak, N. Tóth

A száraz szem és a szisztémás betegségek közötti kapcsolat

Háziorvos továbbképző szemle 23 pp. 15-19., 5 p, 2018

É. Csősz, N. Tóth, E. Deák, **A. Csutak***, J. Tőzsér*

*azonos kontribúció

Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery

International Journal of Molecular Sciences 19 : (12) Paper: 4096 , 19 p. 2018

DOI: 10.3390/ijms19124096

IF: 4.183

L. Csicsik, T. J. MacGillivray, E. Flynn, E. Pellegrini, G. Papanastasiou, N. Barzegar-Befroei, **A. Csutak**, A.C. Bird, C. W. Ritchie, T. Pető et al.

Peripheral Retinal Imaging Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Pilot Study

Ophthalmic Research 59 : (4) pp. 182-192. , 11 p. 2018

DOI: 10.1159/000487053

IF:1.685

B. Antal, M.K.G.S. Tavares, L. Kovács, B. Harangi, I. Lázár, B. Nagy, Gy. Kovács, J.

Szakács, J. Tóth, T. Pető, **A. Csutak**, A. Hajdu.

Data analysis applied to diabetic retinopathy screening: performance evaluation

Annales Mathematicae et informaticae 49 pp. 3-9. , 7 p. 2018

DOI: <http://doi.org/10.33039/ami.2018.10.002>

Orosz, O ; Rajta, I ; Vajas, A ; Takacs, L; **Csutak, A** ; Fodor, M ; Kolozsvari, B ; Resch, M ; Senyi, K ; Lesch, B et al. Myopia and Late-Onset Progressive Cone Dystrophy Associate to LVAVA/MVAVA Exon 3 Interchange Haplotypes of Opsin Genes on Chromosome X 40. 41. 42. 43. 44. 45.

Investigative Ophthalmology and visual science 58 : (3) pp. 1834-1842. , 9 p. 2017

DOI: 10.1167/iovs.16-21405

IF: 3.388

Kasza, M; Meleg, J ; Vardai, J ; Nagy, B Jr ; Szalai, E ; Damjanovich, J ; **Csutak, A** ; Ujhelyi, B ; Nagy, V

Plasma E-selectin levels can play a role in the development of diabetic retinopathy

Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 255 pp. 25-30. , 6 p. 2017

DOI: 10.1007/s00417-016-3411-1

IF: 2.249

É. Csősz, E. Deák, G. Kalló, **A. Csutak**, J. Tőzsér

Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms.

J Proteomics. 6;150:351-358, 2017

DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.034

IF: 3.722

Zs. Balogh, M. Kasza, J. Várdai, I. Reznék, J. Damjanovich, **A. Csutak**, A. Berta, V. Nagy
Analysis of optic disc damage by optical coherence tomography in terms of therapy in non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy

International Journal of Ophthalmology (English version) 9 : (9) pp. 1352-1354. , 3 p. 2016

DOI: 10.18240/ijo.2016.09.20

IF: 1.177

D. Pásztor, B. L. Kolozsvári, **A. Csutak**, A. Berta, H. Ziad, B. Kettesy, P. Gogolák, M. Fodor: Scheimpflug Imaging Parameters Associated with Tear Mediators and Bronchial Asthma in Keratoconus.

J. Ophthalmol. 2016; 2016:9392640. Epub 2016 Jan 12. DOI: 10.1155/2016/9392640.

IF: 1.712

D. Pásztor, B. L. Kolozsvári, **A. Csutak**, A. Berta, Z. Hassan, B. Ujhelyi, P. Gogolák, M. Fodor

Tear Mediators in Corneal Ectatic Disorders.

PLoSOne.11 (4), e0153186-, 2016.

DOI: 10.1371/journal.pone.0153186

IF: 2.806

I. Lengyel, **A. Csutak**, D. Florea, I. Leung, A. C. Bird, F. Jonasson, T. Pető

A Population Based Ultra-Widefield Digital Image Grading Study for AMD-like Lesions at the Peripheral Retina.

Ophthalmology.122 (7), 1340-1347, 2015.

IF: 6.750

G. Kalló, A. Chatterjee, M. Tóth, É. Rajnavölgyi, **A. Csutak**, J. Tőzsér, É. Csősz:

Relative quantification of human beta-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring.

Rapid Commun. Mass Spectrom.29 (18), 1623-1631, 2015.

IF: 2.226

M. Kasza, Z. Balogh, L. Bíró, B. Ujhelyi, J. Damjanovich, **A. Csutak**, J. Várdai, A. Berta, V. Nagy: Vascular endothelial growth factor levels in tears of patients with retinal vein occlusion.

Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.253, 1581-1586, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-015-3030-2>

IF: 1.991

V. Nagy, Z. Balogh, M. Kasza, B. Ujhelyi, **A. Csutak**, I. Reznec, J. Damjanovich, A. Berta, G. Pfliegler

Cardiovascular and thrombophilic risk factors in retinal vein occlusion.

Exp. Clin. Cardiol.20 (1), 238-244 (2014), 2014.

V. Nagy, B. L. Kolozsvári, Z. Balogh, **A. Csutak**, M. Kasza, B. Nagy, L. Kardos, A. Berta, G. Pfliegler

Increased level of platelet P-selectin in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy.

Graefes Arch. Clin. Exper. Ophthalmol.251 (3), 917-922, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-012-2196-0>

IF: 2.333

G. Németh, Z. Hassan, **A. Csutak**, E. Szalai, A. Berta, L. Módis: Repeatability of ocular biomechanical data measurements with a Scheimpflug-based noncontact device on normal corneas.

J. Refract. Surg.29 (8), 558-563, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3928/1081597X-20130719-06>.

IF: 2.781

B. Antal, A. Hajdu, Z. Maros-Szabó, Z. Török, **A. Csutak**, T. Pető: A two-phase decision support framework for the automatic screening of digital fundus images.

J. Comput. Sci.3 (5), 262-268, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocs.2012.01.001>

Csutak, A. Bíró, F. Salló, T. Pető

Képelemző centrumok működése és jelentősége a szemészeti kórképek standard elemzésében és a klinikai gyógyszerkutatásban.

Szemészet.149 (2), 68-74, 2012.

F. Salló, **A. Csutak**, L. Kolozsvári, T. Pető

Az időskori maculadegeneráció etiológiája.
Szemészet.147 (3-4), 121-125, 2010.

S. Benkő, J. Tőzsér, G. Miklóssy, A. Varga, J. Kádas, **A. Csutak**, A. Berta, É. Rajnavölgyi
Constitutive and UV-B modulated transcription of Nod-like receptors and their functional
partners in human corneal epithelial cells.
Mol. Vis.14 (187-188), 1575-1583, 2008.
IF: 2.464

P. Pagani, G. Campanile, **A. Csutak**, G. Bricola, C. E. Traverso
A fibrin-based substrate for in vitro reconstruction of cultured corneal endothelial cells.
Minerva Biotechnol.18 (3), 129-135, 2006.
IF: 0.396

Z. Lampé, L. Békési, **A. Csutak**, A. Berta
Two cases of Terrien's marginal degeneration treated with peripheral full thickness
keratectomy, and followed-up by computer- assisted corneal topography.
Klin. Monatsbl. Augenheilkd.220 (6), 404-410, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-40271>
IF: 0.495

További tudományos mű:

N. Tóth, **A. Csutak**, Z. Hassan, E. Deák, L. Módis, G. Németh
Comparing Refractive and Scheimpflug-image Based Parameters between Right and Left
Eyes and between Dominant and Non-dominant Eyes Related to Handedness
Ophthalmology Research: An International Journal 9 : (3) Paper: OR.46026 , 8 p. (2018)
DOI: 10.9734/OR/2018/46026

Könyvfejezet:

Berta, András ; **Csutak, Adrienne**
Diabeteses retinopathia In: Leövey, A; Nagy, VE; Paragh, Gy; Rácz, K (szerk.)
Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve Budapest, Magyarország :
Medicina Könyvkiadó Zrt., (2017) pp. 576-580. , 5 p.

Csutak, Adrienne ; Tóth, Noémi
Gyulladt száraz szem
In: Berta, András; Csutak, Adrenne; Kolozsvári, Bence; Módis, László (szerk.)
A száraz szem kezelése
Budapest, Magyarország : Baush & Lomb (HU), (2017) pp. 4-11. , 8 p.

Konferenciaközlemény:

Renato, Besenczi ; Kristof, Szitha ; Balazs, Harangi ; Adrienne, Csutak ; Andras, Hajdu
Automatic Optic Disc and Optic Cup Detection in Retinal Images Acquired by Mobile Phone
In: Loncaric, S; Lerski, D; Eskola, H; Bregovic, R (szerk.) ISPA 2015 : 9th International
Symposium on Image and Signal Processing and Analysis Zagreb, Croatia, September 7-9,
2015 Zagreb, Horvátország : Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., (2015) pp.
193-198. , 5 p.

Antal, I. Lázár, A. Hajdu, Z. Török, **A. Csutak**, T. Pető
Evaluation of the grading performance of an ensemble-based microaneurysm detector.
In: Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in
Medicine and Biology Society, Boston, MA, 5943-5946, 2011.

B. Antal, I. Lázár, A. Hajdu, Z. Török, **A. Csutak**, T. Pető
A multi-level ensemble-based system for detecting microaneurysms in fundus images.
In: Soft Computing Applications (SOFA), 2010
4th International Workshopon, Arad, Románia, 137-142, 2010.

B. Antal, A. Hajdu, **A. Csutak**, T. Pető
A two-phase pre-filtering approach to the automatic screening of digital fundus images.
In: 5th International Conference on Signal Processing and Multimedia Applications: SIGMAP
2010, Athén, Görögország, 155-158, 2010.

B. Harangi, R. J. Qureshi, **A. Csutak**, T. Pető, A. Hajdu
Automatic Detection Of The Optic Disc Using Majority Voting In A Collection Of Optic Disc
Detectors. Proc. IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging.1329-1332, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ISBI.2010.5490242>

Hajdu, A ; Peto, T ; Biro, A ; Harangozo, R ; Hulvely, J ; Torok, Z ; **Csutak, A**
Extracting Metadata from Fundus Images for the Screening of Diabetic Retinopathy In: IEEE
(szerk.) WISP 2009 : IEEE International symposium on Intelligent Signal Processing New
York (NY), Amerikai Egyesült Államok : IEEE, (2009) pp. 259-263. , 5 p.
Könyvrészlet/Konferenciaközlemény/Tudományos

Egyetemi doktori (PhD fokozat) megszerzése előtti in extenso

A. Csutak, D.M. Silver, J. Tőzsér, A. Facskó, A. Berta
Plasminogen activator activity and inhibition in rabbit tears after photorefractive keratectomy.
Exp. Eye Res.77 (6), 675-680, 2003.

DOI: 10.1016/j.exer.2003.08.012
IF: 2.611

A. Csutak, J. Tőzsér, Z. Hassan, D.M. Silver, A. Berta
A plazminogén aktivátor aktivitás változásának jelentősége a könnyben fotorefraktív excimer lézerkezelés (PRK) után.
Szemészet.139 (1), 61-65, 2002.

A. Csutak, J. Tőzsér, Z. Hassan, D.M. Silver, A. Berta
Fotorefraktív excimer lézerkezelést (PRK) követő corneális stromahomályok.
Endosc. Minim. Invazív Ter.5 (2), 19-22, 2002.

L. Módis, G. Németh, L. Takács, **A. Csutak**, B. Kettesy, A. Berta
Corneakonzerváló folyadékok összehasonlító vizsgálata.
Szemészet.138 (1), 5-10, 2001.

A. Csutak, J. Tőzsér, L. Békési, Z. Hassan, A. Berta, D.M. Silver
Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.41 (12), 3743-3747, 2000.
IF: 4.373

L. Takács, **A. Csutak**, E. Balázs, L. Módis, A. Berta
Expression of beta IG-H3 is lower than normal in keratoconus corneas but in creases with scarring.
Cornea.18 (5), 599-605, 1999.
IF: 1.198

L. Takács, **A. Csutak**, E. Balázs, A. Berta
Immunohistochemical detection of beta IG-H3 in scarring human corneas.
Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.237 (7), 529-534, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004170050275>
IF: 1.177



DEBRECENI EGYETEM
KUTATÁSHASZNOSÍTÁSI ÉS
TECHNOLÓGIATRANSZFER KÖZPONT

Csutak Adrienne

feltalálói tevékenységéhez kapcsolódó egyes iparjogvédelmi eljárások

Magyar szabadalmi bejelentések (Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala, SZTNH)

BERTA A, CSUTAK A, SPERKA T, TŐZSÉR J

Cím: Eljárás és kit a fibrinolitikus rendszer állapotának mérésére

Ügyszám: P0600891

Benyújtás éve: 2006. – Közzététel éve: 2008.

TŐZSÉR J, MIKLÓSSY G, BERTA A, CSUTAK A

Cím: Rekombináns plazminogén aktivátorinhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és szemcseppként történő alkalmazása korneális szaruhártya fekélyek gyógyításában

Ügyszám: P0700769

Benyújtás éve: 2007. – Közzététel éve: 2009.

TŐZSÉR J, BERTA A, CSUTAK A

Cím: Peptidaldehid inhibitor használata a szem elülső szegmentjében lejátszódó urokináz mediálta proteolitikus degradációs folyamatok blokkolására

Ügyszám: P0700770.

Benyújtás éve: 2007. – Közzététel éve: 2009.

Európai szabadalmi bejelentések (European Patent Office, EPO)

SILVER DM, CSUTAK A, BERTA A, TŐZSÉR J

Cím: Plasminogen activator to prevent corneal and subepithelial haze after laser vision correction surgery

Elsőbbségi év: 2000. Benyújtás éve: 2001.

Közzététel éve: 2009. Közzététel száma: EP1324767 B1

Lajstromszám: EP 1324767

BERTA A, CSUTAK A, SPERKA T, TŐZSÉR J

Cím: Process and kit for measuring the condition of the fibrinolytic system

Elsőbbségi év: 2006. Benyújtás éve: 2007.

Közzététel éve: 2009. Közzététel száma: EP2097011 A2

TOZSER J, BERTA A, CSUTAK A, MIKLOSSY G

Use of urokinase type plasminogen activator inhibitors for the treatment of corneal disorders

Elsőbbségi év: 2007. Benyújtás éve: 2008.

Közzététel éve: 2012. Közzététel száma: EP2224949 B1

Lajstromszám: EP 2224949



DEBRECENI EGYETEM
KUTATÁSHASZNOSÍTÁSI ÉS
TECHNOLÓGIATRANSZFER KÖZPONT

USA-beli szabadalmi bejelentések (US Patent and Trademark Office, USPTO)

SILVER DM, CSUTAK A, BERTA A, TŐZSÉR J

Plasminogen activator to prevent corneal and subepithelial haze after laser vision correction surgery

Elsőbbségi év: 2000. Benyújtás éve: 2001.

Közzététel éve: 2007. Közzététel száma: US7179461 B2

Lajstromszám: US Patent 7,179,461

SILVER DM, CSUTAK A

Method and apparatus for reducing visual aberrations

Bejelentés száma: US 11/497,063

Elsőbbségi év: 2005. Benyújtás éve: 2006.

Közzététel éve: 2007. Közzététel száma: US20070025118 A1

Lajstromszám: US Patent 7,455,408

BERTA A, CSUTAK A, SPERKA T, TŐZSÉR J

Process and kit for measuring the condition of the fibrinolytic system

Bejelentés száma: US 12/474,705

Elsőbbségi év: 2006. Benyújtás éve: 2009.

Közzététel éve: 2010. Közzététel száma: US20100068745 A1

TŐZSÉR J, BERTA A, CSUTAK A, MIKLÓSSY G

Use of urokinase type plasminogen activator inhibitors for the treatment of corneal disorders

Bejelentés száma: US 12/745,165

Elsőbbségi év: 2007. Benyújtás éve: 2008.

Közzététel éve: 2011. Közzététel száma: US20110028397 A1

A fenti adatok megegyeznek a Debreceni Egyetemen vezetett szabadalmi nyilvántartás adataival és az interneten elérhető publikus szabadalmi adatbázisok (EPO, USPTO) adataival. A lista nem tartalmazza a szabadalmi bejelentések / szabadalmi oltalmak státuszát.

Dr. Bene Tamás
központvezető



Debrecen, 2016. június 27.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni egykori főnökömnek és mentoromnak, Berta András Professzor Úrnak, hogy bevezetett a könnykutatás témakörébe és a szemészeti szakma szépségeibe, hasznos tanácsaival segítette mind kutatói mind szemészeti pályafutásom. Biztatott az egyetem egyik első spin-off cégének létrehozásában, és ösztönzött arra, hogy ez az értekezés létrejöhessen.

Külön köszönöm Tőzsér József Professzor Úrnak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet igazgatójának a laboratóriumi munka csodáival való megismertetést, hasznos tanácsait, mellyel mindvégig segítette kutató munkáinkat. Külön köszönöm, hogy spin-off cégünk létrehozásában és működtetésében mindvégig támogatott kitartó munkájával. A nehézségek során mellettem állt, újabb és újabb pályázatok benyújtására biztatott, melyek megvalósításában elengedhetetlen segítséget nyújtott.

Baráti köszönettel tartozom David Silver Professzor úrnak (Johns Hopkins University, APL, Baltimore, USA) statisztikai elemzéseiről, közleményeink és szabadalmaink elkészítésében nyújtott elengedhetetlen segítségéért.

Hassan Ziad doktor úrnak, hogy biztosította számomra a humán tanulmányok és az állatkísérletek elvégzéséhez szükséges refraktív sebészeti feltételeket. Ezen vizsgálatok elvégzésében mérhetetlen segítséget nyújtott számomra Sefcsik István, a Debreceni Egyetem állatorvosa.

A könnyminták proteomikai vizsgálatairól Csősz Évának a Proteomika Szolgáltató Laboratórium vezetőjének tartozom köszönettel, és hálás vagyok a sorsnak, hogy munkáink egyre szorosabban fonódhattak össze az évek során. Nagy megtiszteltetés számomra, hogy közösen alapíthattuk meg a proteomikai munkacsoportunkat és könnykutatásaink ezáltal egyre szélesebb körű proteomikai platformra helyeződtek.

Köszönöm Hajdú Andrásnak, az Informatikai Tanszék igazgatójának, hogy érdeklődésemet a cukorbeteg páciensek fundusképének elemzését illetően informatikai síkra terelte, és az általunk tanulmányozott két kutatási területet összefonva is vizsgálhattuk.

Ezen vizsgálatok ösztönzésében kiemelt támogatást kaptunk egykori főnökömtől, Pető Tünde Professzor Asszonytól (Ophthalmology Department, Queen's University, Belfast), akinek baráti köszönettel tartozom a diabéteszes retinopátia szűrésébe történő bevezetésért.

Hálás vagyok Szalai Eszter kolléganőmnek, hogy érdeklődésemet a szemfenéki képek vizsgálatairól a szaruhártyára irányította, és közös kutatásainkat szakmai tudásával segítette elő.

Köszönöm a Debreceni és a Pécsi Szemklinika, a Debreceni Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, a Proteomika Szolgáltató Laboratórium, az Informatikai Kar, Kutatócsoportunk, Társszerzőim, PhD hallgatóim, és az InnoTears Kft. valamennyi dolgozójának támogatását, hasznos tanácsaikat, sokoldalú szakmai támogatásukat.

Végezetül, de nem utolsó sorban mindenek felett hálás vagyok szüleimnek, hogy feltételek nélkül támogattak pályafutásom során és mindvégig mellettem álltak az élet nehéz pillanataiban. Ezen bátorítás és támogatás eredménye ez a munka is. Köszönöm családomnak, férjemnek és gyermekeimnek, hogy szeretetükkel mindvégig mellettem álltak.